

Charakterisierung von *Fusarium* spp. -mit Reporterproteinen transformiert- und deren Interaktionen an Weizen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katharina Piel (geb. Eiden)

aus

Bergisch Gladbach

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-W. Dehne

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Bartels

Tag der Promotion: 26.11.2013

Erscheinungsjahr: 2014

Meinen Eltern

Kurzfassung

Katharina Eiden

Charakterisierung von *Fusarium* spp. -transformiert mit Reporterproteinen- und deren Interaktionen an Weizen

Der Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung von Interaktionen zwischen zwei unterschiedlichen *Fusarium*-Arten. Daher wurde jeweils ein Isolat der beiden *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* wurde mit den Genen für die fluoreszierenden Reporterproteine EGFP und DsRed-Express nach Protoplastierung der Myzelien transformiert. Der Transformationserfolg wurde an antibiotikaresistenten Transformanten mikroskopisch mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft und die Integration der Fremdgene mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse molekularbiologisch nachgewiesen. Sowohl das grünfluoreszierende EGFP als auch das rotfluoreszierende DsRed-Express wurden ausschließlich im Cytosol von Myzel und Konidien beider *Fusarium*-Arten nachgewiesen, da aufgrund eines fehlenden Transportsignals die Proteine in keinem weiteren Zellkompartiment exprimiert wurden. Da für weiterführende Experimente *in vitro* und *in situ* nur solchen Transformanten eingesetzt werden sollten, die sich in Fitness, Vitalität und Pathogenität an der Wirtspflanze Weizen nicht von den entsprechenden Wildtypen unterschieden, wurden Fitnesstests das Myzelwachstum, die Sporulation und die Infektionsfähigkeit an der Pflanze betreffend durchgeführt. Mittels TaqMan[®] Real-time PCR wurde das Wachstum von Wildtypen und Transformanten im Laufe der Infektion von einzeln und koinokulierten Weizenähren quantitativ bestimmt und das Spektrum an produzierten Mykotoxinen mit LC-MS/MS bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die deutlich aggressivere Art *F. graminearum* durch die Anwesenheit von *F. avenaceum* im Wachstum stark beeinträchtigt wurde. Der DNA-Gehalt von *F. graminearum* in der Kombinationsvariante war im Vergleich zur Einzelvariante um 62% geringer. In der Folge reagierte das in dieser Arbeit verwendete nivalenolbildende *F. graminearum*-Isolat mit einer signifikant erhöhten Produktion dieses Mykotoxins. Als Fazit ergibt sich, dass es zwischen beiden *Fusarium*-Arten Interaktionen gibt. Dies ist für die Entwicklung von Fusariosen an Weizenähren, die Populationsdynamik in den Beständen und der daraus folgenden Kontamination des Erntegutes von großer Bedeutung.

Abstract

Katharina Eiden

Characterization of *Fusarium* spp. –transformed with reporter genes- and their interactions on wheat

To investigate the interactions between two different *Fusarium* species they were labelled with fluorescent reporter proteins. Isolates of *F. avenaceum* and *F. graminearum* were transformed with the genes for the fluorescent reporter proteins EGFP and DsRed-express by preparing protoplasts from mycelium. hygromycin resistance. Drug resistance against hygromycin serves as a selection marker and the transformation was analysed microscopically. For proving the integration of the reporter genes EGFP und DsRed-express into the genome of the fungi a Southern blot analysis was done. Because of the lack of a transport signal sequence both strains express bright fluorescence in the cytosol of living hyphae and macroconidia. Before starting investigations of the interactions between labelled *Fusarium* species it had to be confirmed that there were no differences between the transformants and the respective wildtype concerning *in vitro* growth, sporulation and infection of host plants. Thus diverse fitness studies were conducted. Growth of wildtypes and transformants during the infection process in single and in coinoculated ears was analysed by using TaqMan[®] Real-time PCR, while mycotoxin contamination was determined using LC-MS/MS. Concerning fungal growth the more aggressive species *F. graminearum* was highly inhibited in presence of *F. avenaceum*. The content of DNA of *F. graminearum* in ears coinoculated with *F. avenaceum* was decreased by 62%. As a consequence the isolate of *F. graminearum*, which was described to produce the mycotoxin nivalenol, showed a significantly increased synthesis of this mycotoxin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Organismen	8
2.1.1	Mikroorganismen	8
2.1.1.1	<i>Fusarium</i> spp.	8
2.1.1.2	<i>Escherichia coli</i>	8
2.1.2	Pflanzen	9
2.2	Kultur und Kulturmedien	9
2.2.1	Mikroorganismen	9
2.2.1.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Fusarium</i> spp.	9
2.2.1.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	10
2.2.2	Pflanzenanzucht	10
2.3	Chemikalien für mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen	11
2.4	Markierung von <i>Fusarium</i> spp. mit Reportergenen für fluoreszierende Proteine	12
2.4.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	12
2.4.2	Transformation von <i>Fusarium</i> -Isolaten	12
2.5	Molekularbiologischer Nachweis der Integration der Reportergene mittels eines Southern Blots	14
2.5.1	Herstellung der radioaktiven Sonden	15
2.5.2	Gelelektrophorese und Kapillarblot	16
2.5.3	Hybridisierung der Membran	17
2.6	Inokulationstechniken	18
2.6.1	Herstellung von Inokulum	18
2.6.2	Inokulation von Weizenblättern	18
2.6.3	Inokulation von Weizenähren	19
2.7	Probenahme	20
2.8	<i>In vitro</i>-Tests zu Wachstum und Sporulation	20
2.8.1	Myzelwachstumstests	20
2.8.2	Sporulationstests	20
2.8.3	Myzelwachstum unter Einfluss von Mykotoxinen	21
2.8.3.1	Mykotoxin-Filter-Test	21
2.8.3.2	Mykotoxin-Test mit Agarstück	21

2.8.4	Myzelwachstum unter Einfluss von Ferulasäure	21
2.9	Molekularbiologische Untersuchungen	22
2.9.1	DNA-Extraktion	22
2.9.1.1	DNA-Extraktion aus <i>Fusarium</i> -Myzel	22
2.9.1.2	DNA-Extraktion aus Weizenblättern	23
2.9.1.3	DNA-Extraktion aus Weizenähren	24
2.9.2	TaqMan® Real-time Polymerase Chain Reaction	25
2.9.2.1	Eichstandards	25
2.9.2.2	Plasmid-Präparation der internen PCR-Kontrolle	25
2.9.2.3	Durchführung der TaqMan® Real-time PCR	25
2.10	Multimykotoxinanalyse	27
2.11	Extraktion und Detektion von Ferulasäure	28
2.11.1	Isolation von Ferulasäure aus Weizenähren	29
2.11.1.1	Isolation löslicher Ferulasäure	29
2.11.1.2	Isolation zellwandgebundener Ferulasäure	29
2.12	Mikroskopische Techniken	30
2.12.1	Stereomikroskopie	30
2.12.2	Fluoreszenzmikroskopie	30
2.12.3	Konfokale Laser-Mikroskopie	30
2.13	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	32
3.1	<i>Fusarium</i> spp. markiert mit Reporterproteinen	32
3.1.1	Erhalt von transformierten <i>Fusarium</i> spp.	32
3.1.2	Effizienz der Transformation	33
3.1.3	Expression der Reporterproteine in <i>Fusarium</i> spp.	33
3.1.4	Stabilität der Transformanten	36
3.1.5	Integration der Gene für Reporterproteine	37
3.2	Einfluss der Transformation auf die Fitness der Transformanten von <i>Fusarium</i> spp.	39
3.2.1	Auswirkungen auf das Myzelwachstum	39
3.2.1.1	Wachstum auf Vollmedium	40
3.2.1.2	Wachstum auf Minimalmedium	44
3.2.2	Auswirkungen auf die Sporulation	47

3.3	Pathogenität an Wirtspflanzen	48
3.3.1	Befallsentwicklung an Weizenblättern	48
3.3.2	Infektion von Weizenährchen	52
3.4	Interaktionen zwischen <i>Fusarium</i> spp. <i>in vitro</i>	56
3.5	Interaktionen zwischen <i>Fusarium</i> spp. an Weizen	60
3.5.1	Biomasse an Weizenblättern	60
3.5.2	Biomasse an Weizenähren	60
3.5.2.1	Makroskopisch sichtbare Entwicklung	60
3.5.2.2	Quantitative Erfassung der Pilzentwicklung	62
3.5.3	Einfluss der verschiedenen Inokulationsvarianten auf die Mykotoxin-Produktion in Weizenähren	66
3.5.4	Sensitivität von <i>Fusarium</i> spp. für Trichothecene	69
3.5.5	Einfluss von Ferulasäure auf die Pilzentwicklung	72
3.5.5.1	Sensitivität von <i>Fusarium</i> spp. auf Ferulasäure	72
3.5.5.2	Abbau von Ferulasäure <i>in vitro</i> durch <i>Fusarium</i> spp.	78
3.5.5.3	Einfluss von <i>Fusarium</i> spp. auf den Gehalt an Ferulasäure in Ähren	79
4	Diskussion	82
5	Zusammenfassung	106
	Literaturverzeichnis	109
	Erklärung	128

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
A. demin.	Aqua demin. (demineralisiertes Wasser)
BBCH	morphologisches Entwicklungsstadium einer Pflanze
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
dATP	Desoxyadenosinnukleotidtriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRed	Bezeichnung für DsRed codierendes Gen
DON	Deoxynivalenol
E.	<i>Escherichia</i>
egfp	Bezeichnung für EGFP codierendes Gen
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
F.	<i>Fusarium</i>
FAVEGFP	<i>Fusarium avenaceum</i> transformiert mit Reportergen für EGFP
FAVDsRed	<i>Fusarium avenaceum</i> transformiert mit Reportergen für DsRed
FAM	Carboxy-Fluorescein
FGREGFP	<i>Fusarium graminearum</i> transformiert mit Reportergen für EGFP
FGRDsRed	<i>Fusarium graminearum</i> transformiert mit Reportergen für DsRed
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
g	Erdschwerebeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
h	Stunde
ha	Hektar
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruck- Flüssigchromatographie)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

l	Liter
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
LC/MS-MS	Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie
LSD	Least Significant Difference (kleinster signifikanter Unterschied)
M	molar
m	Meter
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NIV	Nivalenol
p	probability (Fehlerwahrscheinlichkeit)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
pg	Pikogramm
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
qPCR	TaqMan® Real-time Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SNA	Synthetic Nutrient Agar
spp.	species pluralis
ssDNA	single stranded DNA (einzelsträngige DNA)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Taq	Thermus aquaticus
TM	Trockenmasse
u	unit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
v/v	volume per volume (Volumen/Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Im Laufe der gesamten Menschheitsgeschichte wurde Weizen weltweit als lebensnotwendige Nahrungsgrundlage kultiviert. Ausgehend von den Ländern im Nahen Osten, in denen sich die Wildformen des Weizens ursprünglich fanden, entstanden, Hand in Hand mit der Entwicklung der Menschheit und deren Siedlungen einhergehend, pflanzenbauliche Produktionstechniken zur Erzeugung von Nahrungsmitteln. Auch in heutiger Zeit zählt Weizen, der zur Familie der Süßgräser (*Gramineae*) gehört, zu den weltweit wichtigsten Nutzpflanzen, mit den bedeutendsten Anbaugebieten in Europa, Nordamerika und Asien. Stets folgt der Kultivierung und dem verbreiteten Anbau von Nutzpflanzen aber die Problematik der Krankheitsanfälligkeit, wobei im Falle von Getreide Pilzinfektionen eine herausragende Rolle spielen.

Nur achttausend von circa hunderttausend Pilzarten sind Pflanzenpathogene, aber der Befall von Nutzpflanzen mit diesen Organismen kann aufgrund von Ertragsverlusten und Verminderung der Qualität verheerende Auswirkungen haben (Agrios 2005). Betroffen hiervon sind alle Vertreter der Familie der Süßgräser wie Weizen, Hafer, Gerste, Mais und Roggen, die von mehreren Arten der Gattung *Fusarium* befallen werden können. Pilze dieser Gattung weisen ein breites Wirtsspektrum auf und sind in der Lage die verschiedenen Teile der Getreidepflanzen in allen Entwicklungsstadien zu infizieren. Hierbei wird die Blüte als das anfälligste Stadium beschrieben (PARRY et al. 1995), da durch die Antheren zum einen Nährstoffe geliefert werden und durch unterschiedliche Mechanismen das pilzliche Wachstum gefördert wird (Osborne und Stein 2007). Die durch diese Pilze verursachte Partielle Taubährigkeit wurde vor mehr als einem Jahrhundert 1884 das erste Mal beschrieben und erhielt ihren Namen aufgrund des Symptoms der im Laufe der Krankheit in zunehmendem Maße ausbleichenden Ährchen (Dickson und Green 1929; McMullen J. et al. 1997b). Das Einwachsen des Pilzes in die Ährenspindel führt zu einer derart massiven Zerstörung des Gewebes, dass die Nährstoff- und Wasserversorgung zum darüber liegenden Teil der Ähre abgeschnitten wird. Dieser Bereich bleicht in der Folge dieser als systemisch beschriebenen Infektion aus und stirbt schließlich ab (Hutcheon 1992). Zusätzlich kommt es zur Bildung von Schmachtkörnern, deren Tausendkorngewicht erheblich reduziert ist, was aus der Zerstörung von Zellwänden, Speicherstärke und Korngewebe durch die in das Korn eindringenden Pilze resultiert (Snijders 1990; Jackowiak et al. 2005).

Als Haupterreger der weltweit auftretenden Partiellen Taubährigkeit an Weizen gelten *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* (Teleomorph *Gibberella zeae*), *Microdochium nivale* (Teleomorph *Monographella nivalis*), *F. poae* und *F. avenaceum* (Teleomorph *G. avenacea*) (PARRY et al. 1995; Miedaner 1997; Simpson et al. 2000; Tekauz et al. 2000). Die Verteilung und die Dominanz der verschiedenen Pathogene werden zuvörderst durch klimatische Einflüsse, und hierbei besonders durch Temperatur und Feuchtigkeit, bestimmt. Generell besteht ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Infektion und einer hohen Luftfeuchte, gepaart mit kühlen oder warmen Temperaturen, wobei sich das an einem Standort vorhandene Artenspektrum aufgrund orts- und jahresspezifischer Faktoren aus unterschiedlichen *Fusarium*-Arten zusammensetzt (Xu et al. 2004). Insgesamt werden bis zu siebzehn verschiedene Arten der Gattung *Fusarium* mit der Partiellen Taubährigkeit in Verbindung gebracht, wobei *F. graminearum* in vielen Teilen der Welt als der Haupterreger dieser Krankheit gilt (PARRY et al. 1995). Während dieser neben *F. culmorum* in den warmen und feuchten Regionen der Erde wie Zentraleuropa, den USA, China und der südlichen Hemisphäre häufiger anzutreffen ist, kommt *F. avenaceum* neben Zentraleuropa auch in den kälteren Regionen von Nordeuropa und Kanada vor (PARRY et al. 1995; Bottalico und Perrone 2002; Turkington T. K. et al. 2002; Kosiak et al. 2003; Yli-Mattila et al. 2004). *F. avenaceum* weist generell eine geringere Pathogenität als *F. graminearum* auf (Abbas et al. 1987; Kang et al. 2005).

Weltweit stellt das Auftreten dieser Krankheit für die Weizenproduktion ein Problem von großer wirtschaftlicher Bedeutung dar, da die verschiedenen *Fusarium*-Arten für Mensch und Tier toxische Sekundärmetabolite, sogenannte Mykotoxine bilden (Bai und Shaner 1994; PARRY et al. 1995). Solche Sekundärmetabolite sind nicht essentiell für Wachstum, Entwicklung oder Reproduktion von Organismen, die Bedeutung dieser Substanzen liegt darin, einen ökologischen Vorteil zu verschaffen (Payne und Brown 1998). Mykotoxine werden von Pathogenen der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* und *Fusarium* produziert und kontaminieren das Getreide vor oder nach der Ernte (Bottalico 1998). Eine Bekämpfung mit Fungiziden führt noch nicht zu zufriedenstellenden Erfolgen, da keine Wirkstoffe erhältlich sind, die die Entwicklung von *Fusarium*-Arten und damit die Akkumulation der toxischen Sekundärmetabolite, vollständig unterbinden können (Champeil et al. 2004). Als der beste Weg, den Gehalt an Mykotoxinen im Getreide für Futter oder Nahrungsmittel zu verringern oder ihre Produktion sogar zu unterbinden, wird der Ansatz angesehen, ihre Biosynthese schon vor der Ernte zu verhindern (Boutigny et al. 2009).

Fusarium-Arten bilden unterschiedliche Typen und Mengen von Mykotoxinen, wobei Trichothecene, Zearalenon, Fumonisin, Moniliformin und Enniatine dominieren (Desjardins 2006). Verglichen mit anderen *Fusarium*-Mykotoxinen stehen Trichothecene an erster Stelle als Ursache für gefährliche Mykotoxikosen bei Mensch und Tier, da sie eine Hemmung der Proteinbiosynthese hervorrufen und eine immunsuppressive Wirkung besitzen (Tag et al. 2001). Allerdings wird nur ein Teil aller existierenden Trichothecen-Derivate für die natürliche Kontamination von Getreide verantwortlich gemacht. Aufgrund chemischer Eigenschaften werden diese hochstabilen, zyklischen Sesquiterpenoide in zwei Gruppen unterteilt.

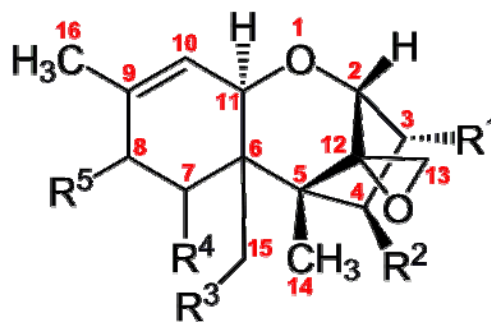


Abb. 1: Strukturformel von Trichothecen (Desjardins, 2006)

Zu Gruppe A gehören T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Diacetoxyscirpenol, während zu Gruppe B Deoxynivalenol, Nivalenol, 3- und 15-Acetyldeoxynivalenol zählen (Bottalico 1998). Die Typ-A-Trichothecene besitzen eine Ketogruppe an der C8-Position, die den Typ-B-Trichothecen fehlt (Abb.1). Die *Fusarium*-Isolate, die in der Lage sind Trichothecene zu bilden, werden ihrerseits in zwei verschiedene Gruppen, sogenannte Chemotypen, unterteilt. Der Deoxynivalenol (DON)-Chemotyp umfasst Isolate, die Deoxynivalenol und Acetyldeoxynivalenol produzieren, der Nivalenol (NIV)-Chemotyp hingegen Isolate, die Nivalenol und Fusarenon X synthetisieren (Sydenham et al. 1991; Szécsi und Bartók 1995).

Möglicherweise stellt die Sekretion von Trichothecen in das Pflanzengewebe durch trichothecenbildende *Fusarium*-Arten einen Virulenzfaktor dar, da Mutanten von *F. graminearum*, denen durch die Deletion eines Gens des Trichothecen-Biosyntheseweges, die Fähigkeit Trichothecene zu bilden, genommen wurde, eine reduzierte Virulenz aufwiesen und nicht in der Lage waren, sich in der Pflanze auszubreiten (Proctor et al. 1995; Bai et al. 2002; Mesterhazy 2002; Jansen 2005). In der Literatur wurde beschrieben, dass während der Kolonisierung der äußeren Oberflächen der Pflanzenteile bereits Trichothecene in das

Pflanzengewebe abgegeben werden (Kang 2002). Mit Hilfe von Immuno-Gold-Markierung wurde nachgewiesen, dass Mykotoxine in Xylem und Phloem transportiert werden und so vor der Invasion des Pilzes schon in das Gewebe vordringen (Jansen 2005). Es wurde diskutiert, dass die erhöhte Virulenz von *Fusarium*-Arten, die Trichothecene bilden, in dem inhibitorischen Effekt der Toxine auf die Proteinbiosynthese der Pflanze begründet ist. Trichothecene werden von *F. culmorum*, *F. graminearum* und *F. poae* produziert.

Moniliformin, ein kleines, ionisches Molekül, und die Enniatine, nichtribosomale, zyklische Depsipeptide, sind Sekundärmetabolite, die von *F. avenaceum* und *F. poae* synthetisiert werden (Desjardins op. 2006). Enniatine besitzen eine antibiotische und phytotoxische Wirkung (Burmeister 1987).

Die Zellwände der Wirtspflanze sind die Hauptbarriere, die Pathogene überwinden müssen, um die Pflanze besiedeln zu können, und sind dementsprechend komplex aufgebaut. Die Mittellamelle, die Interzellulärsubstanz, die die einzelnen Zellen fest miteinander verbindet, besteht aus Protopektin und liegt direkt der Primärzellwand auf. Diese wiederum setzt sich zusammen aus einem Netz von Zellulosefibrillen eingebettet in eine protopektinähnliche Grundsubstanz mit Hemizellulosen und Strukturproteinen, die sogenannte Matrix. Die Sekundärwand besitzt einen wesentlich höheren Anteil an Zellulose. Sowohl die nach außen gerichteten (abaxialen) Oberflächen der Epidermiszellen von Hüll- (Gluma), Deck- (Lemma) und Vorspelze (Palea) und Rachis, als auch die darunterliegenden sklerenchymähnlichen Hypodermiszellen, besitzen stark verdickte, lignifizierte Zellwände (Pugh et al.). Die Zellwände monokotyler Pflanzen, insbesondere die der Familie der *Graminae*, enthalten zudem phenolische Komponenten, die meisten von ihnen über Esterbrücken mit den Polysacchariden der Zellwände verbunden (Smith und Hartley 1983; Mueller-Harvey et al. 1986). Wie die Mykotoxine zählen sie zu den Sekundärmetaboliten und sind aufgrund ihrer starken antioxidativen Eigenschaften an der Resistenz gegen die Partielle Taubährigkeit beteiligt (Wallace und Fry 1994; Hamzehzarghani et al. 2005). Ein besonders hoher Anteil dieser Phenolsäuren ist in den äußeren Gewebe reifer Weizenkörner zu finden (Fulcher 1982). Der vorrangige Vertreter dieser Säuren in Getreide ist die Ferulasäure, ein Derivat der Zimtsäure, die, im Vergleich zu anderen Phenolsäuren wie Kaffee- und Cumarsäure, in wesentlich höheren Konzentrationen zu finden ist (Siranidou et al. 2002; Zhou et al. 2007). Ferulasäure besitzt einen signifikanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der pflanzlichen Zellwände, da sie Zellwandkomponenten wie Polysaccharide und Lignin miteinander vernetzt (Besle et al. 1994).

Bei der Infektion einer Pflanze durch ein Pathogen werden diese phenolischen Zellwandkomponenten entweder als Antioxidantien aus der Bindung in der Zellwand freigesetzt oder erst in größeren Mengen produziert. Diese lagern sich dann an der Infektionsstelle ab oder werden erneut in die pflanzliche Zellwand eingebaut (Bell 1981; Nicholson und Hammerschmidt 1992). Für pflanzenpathogene Pilze wurde neben der Produktion von Mykotoxinen die Sekretion von zellwandlytischen Enzymen als weiterer Pathogenitätsfaktor beschrieben. Mit Hilfe von Immuno- und Enzym-Gold-Markierungen wurde die Produktion von Pektinasen, Zellulasen, Xylanasen und Lipasen in verschiedenen *Fusarium*-Arten nachgewiesen (Kang und Buchenauer 2000a; Wanjiru et al. 2002; Kang et al. 2005; Voigt et al. 2005). Diese zellwandlytischen Hydrolasen der Pilze werden durch den erhöhten Gehalt an Ferulasäure, den die Infektion mit einem Pflanzenpathogen zur Folge hat, inaktiviert (Bell 1981). Auf Seiten der Pflanze wird als Antwort auf den Angriff durch Pilze mit der Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Serie von Abwehrmaßnahmen in Gang gesetzt (Repka 1999; Boutigny et al. 2009). Eine dieser Verbindungen, die oxidativen Stress auslösen, ist Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In der Folge kommt es zu der bereits beschriebenen Freisetzung der antioxidativ wirkenden Ferulasäure. Dieser Vorgang wiederum hat Einfluss auf die Trichothecen-Biosynthese und das Pilzwachstums. Zum einen besitzt Ferulasäure in ungebundener Form einen fungistatischen Effekt auf *Fusarium*-Arten, zum anderen übt sie eine inhibitorische Wirkung auf die Produktion von Mykotoxinen aus (Assabgui et al. 1993; Guiraud 1995; Hua et al. 1999; Bily et al. 2003).

Bezüglich der Resistenzmechanismen, die die Mykotoxin-Synthese, aber auch die Infektion von Weizenpflanzen betreffen, existieren zum Teil vergleichsweise wenige Studien, die den Einfluss der Anwesenheit einer weiteren infizierenden *Fusarium*-Art zum Gegenstand haben. Die Partielle Taubährigkeit wird von einem Erreger-Komplex hervorgerufen, was bedeutet, dass mehrere *Fusarium*-Arten das gleiche Habitat besiedeln und demzufolge vermutlich in irgendeiner Form miteinander interagieren, um zu überleben. Solche Interaktionen können während der ersten Phase der Kolonisierung auf den äußeren Flächen der verschiedenen Pflanzenteile stattfinden, aber auch im weiteren Verlauf der Infektion, wenn die Pilze in das Pflanzengewebe eindringen. Bisher wurde in der Literatur vor allem die Entwicklung von *Fusarium*-Arten in Gegenwart einer anderen Art dieser Gattung, die Mykotoxin-Produktion und der Einfluss von Temperatur und Wasseraktivität beschrieben. Allerdings betrafen diese Untersuchungen vor allem die Interaktionen zwischen *F. graminearum*, *F. moniliforme* und *F. proliferatum* (Reid et al. 1999; Velluti et al. 2000; Simpson et al. 2004).

Um weitere Aussagen über den Charakter dieser Interaktionen innerhalb der Wirtspflanze auch auf mikroskopischer Ebene machen zu können, erschien es von Vorteil, die *Fusarium*-Arten so zu verändern, dass sie auf den ersten Blick voneinander zu unterscheiden wären. Die mikroskopische Differenzierung erfolgt in der Regel anhand ihrer Sporen und Sporangien, da das Myzel dieser Pilze eine fast identische Struktur aufweist und ohne Hilfsmittel, wie zum Beispiel histologische Färbungen, im Pflanzengewebe kaum auszumachen ist. Eine Vorgehensweise, die für die Lösung dieses Problems ausgesprochen gut geeignet ist, ist die Transformation der *Fusarium*-Arten mit den Genen für fluoreszierende Reporterproteine, wie zum Beispiel EGFP und DsRed-Express. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und dient, seitdem seine cDNA 1992 von Prasher zum ersten Mal kloniert wurde, als Reporter und Markergen in vielen heterologen Systemen, sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten (Prasher et al. 1992; Chalfie et al. 1994). Dieses 238 Aminosäuren große und 27 kDa schwere Protein absorbiert Licht mit einem Maximum bei 395 nm und 475 nm und emittiert Licht mit einem Maximum bei 508 nm. Für die Fluoreszenz sind nur UV- oder Blaulicht und Sauerstoff zur Chromophorbildung von Nöten, ansonsten ist seine Aktivität weder von Kofaktoren noch Substraten abhängig und die Bildung des fluoreszierenden Chromophors nicht artspezifisch (Spellig et al. 1996; Lorang et al. 2001).

Obwohl die Expression der Proteine in einigen Systemen, wie *Caenorhabditis elegans* und *Escherichia coli*, sehr gut vonstattenging, traten bei Pflanzen- und Säugerzellen Schwierigkeiten auf. Aus diesem Grund wurde an der Weiterentwicklung des Wildtyp-Proteins gearbeitet, durch Mutationen des Chromophors entstanden Varianten, die stärker exprimiert werden, heller sind und einen weiteren Spektralbereich abdecken, so zum Beispiel das enhanced-GFP (EGFP) (Cubitt et al. 1995). Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert das Protein grünes Licht der Wellenlänge 507 nm (Cormack et al. 1996). Neben dem EGFP bietet die Natur unter anderem auch ein im roten Bereich des Spektrums fluoreszierendes Protein, das DsRed auf. Ursprünglich stammt die Wildtyp-Form dieses Proteins von der Rifffkoralle *Discosoma* sp.. Die Struktur ähnelt der des GFP, allerdings neigt das DsRed dazu Tetramere zu bilden (Matz et al. 1999). Auch von diesem Protein existieren verschiedene Abwandlungen, die eine bessere Löslichkeit aufweisen und in Säugerzellen stärker exprimiert werden. Bei der Variante DsRed-Express wurden neun Aminosäuren ausgetauscht, was eine verbesserte Reifung und Löslichkeit zur Folge hatte. Zudem wurden hierdurch die Emission von grünem Licht und die Neigung zur Aggregation herabgesetzt (Bevis und Glick 2002).

Das Anregungsmaximum liegt bei 557 nm und das Emissionsmaximum bei 579 nm. Genau wie das GFP benötigt dieses Fluoreszenzprotein weder Kofaktoren noch Substrate zur Emission des roten Lichts und eignet sich aufgrund relativ weit auseinander liegender Emissionsmaxima hervorragend dazu, mit dem grünen Protein zum Dual-Labeling eingesetzt zu werden.

Die Expression der Reporterproteine in filamentösen Pilzen erfordert einen starken, konstitutiven Promotor, dessen Funktionsfähigkeit wurde für eine große Anzahl von Ascomyceten beschrieben (Lorang et al. 2001; Mikkelsen et al. 2003; Pöggeler et al. 2003). Aus diesem Grund werden in Transformationsansätzen häufig Vektoren eingesetzt, in denen die Gene für das jeweilige Reporterprotein und den Selektionsmarker unter der Kontrolle des *gpd*-Promotors aus *Aspergillus nidulans* stehen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen der *Fusarium*-Arten, *F. avenaceum* und *F. graminearum*, an der Wirtspflanze Weizen näher zu charakterisieren. Da in diese Studien mikroskopische Untersuchungen miteinbezogen werden sollten, wurden die Pilze so verändert, dass ein Auffinden auf und im Gewebe von Blättern und Körnern erleichtert würde. Zu diesem Zwecke sollten Klone der beiden *Fusarium*-Arten hergestellt werden, die die Gene für fluoreszierende Reporterproteine exprimierten. Da für weiterführende Untersuchungen gewährleistet sein musste, dass sich die Wildtypen der jeweiligen *Fusarium*-Arten und ihre Mutanten bezüglich des Wachstums, der Sporulation und der Virulenz gegenüber den Wirtspflanzen nicht unterschieden, sollten Vitalitäts- und Fitness-Tests durchgeführt werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie sollte das Vorhandensein der *Fusarium*-Arten im Pflanzengewebe dokumentiert werden. Mit geeigneten Transformanten sollten dann einzeln und in Kombination Weizenblätter und -ähren inokuliert werden und die Biomasse der jeweiligen Arten quantitativ mittels TaqMan Real-time PCR bestimmt werden. Des Weiteren sollten mit einer Multimykotoxinanalyse die in den Ähren gebildeten Mykotoxine und mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) der Gehalt an Ferulasäure, einer Zellwandkomponente, erfasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Mikroorganismen

2.1.1.1 *Fusarium* spp.

Für die Versuche wurden Einzelsporisolate von fünf verschiedenen *Fusarium* – Arten eingesetzt, die aus Weizenproben aus unterschiedlichen Regionen in Deutschland stammten (Tab. 1) und aus der Mykothek des Instituts für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn entnommen wurden.

Tab. 1: Für Transformationen und weiterführende Experimente eingesetzte Isolate der *Fusarium*-Arten

Isolat	Isolat - Nummer	Herkunft
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fries) Saccardo	1.15	Klein-Altendorf (2004)
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo	3.38	Lichtenhagen (2004)
<i>Fusarium graminearum</i> (Schwabe) (Nivalenol bildendes Isolat)	5.15	Kerpen-Buir (2003)
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenweber	7.15	Klein-Altendorf (2004)
<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Saccardo	10.2	Deutschland (-)

2.1.1.2 *Escherichia coli*

2.1.1.2.1 Plasmide für Transformation

Die in den Transformationen eingesetzten Plasmide pSM1, pPgpD-DsRed und pUCW18 (Mikkelsen et al. 2003; Pöggeler et al. 2003) wurden zur langfristigen Lagerung in chemisch kompetente *E. coli* (TransforMax™ EPI300™, Epicentre Biotechnologies) transformiert. Mit einer Kolonie dieser transformierten *E. coli* wurden 5 ml LB-Medium in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Kultur wurde für etwa zwölf Stunden bei 350 rpm und 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Zu 300 µl dieser Kulturen wurden 700 µl 50%iges (v/v) Glycerin gegeben und diese als Dauerkulturen bei –80°C eingefroren.

2.1.1.2.2 Plasmid für interne PCR-Kontrolle

Zur Herstellung der internen PCR-Kontrolle (IPC) für die TaqMan[®] Real-time PCR wurde eine *E. coli*-Kultur verwendet, deren Plasmid eine Sequenz des Potato Leaf Roll Virus (PLRV)-Genoms (GenBank accession Y07496) trägt (Waalwijk et al. 2004).

2.1.2 Pflanzen

Der in den Versuchen verwendete Sommerweizen (*Triticum aestivum*) der Sorte Tybalt wurde von der Saaten-Union bezogen und besaß die Anfälligkeitsstufe 6 bezüglich des Befalls mit Ährenfusariosen (Anonym 2007).

2.2 Kultur und Kulturmedien

2.2.1 Mikroorganismen

Die Mikroorganismen wurden zum einen in Flüssigmedien kultiviert, die in Erlenmeyerkolben unterschiedlicher Größe angesetzt und anschließend bei 121°C für zwanzig Minuten autoklaviert wurden. Zum anderen fanden Anzucht und Kultur auf festen Nährmedien statt, die ebenfalls autoklaviert und anschließend in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen wurden.

2.2.1.1 Nährmedien zur Kultivierung von *Fusarium* spp.

Potato Dextrose Agar (PDA)

39 g Potato Dextrose Agar in 1000 ml Aqua dest.

Synthetischer Nährstoffarmer Agar (SNA) (Nirenberg 1981)

KH ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
Glukose	0,2 g
Saccharose	0,2 g
Agar-Agar	15 g
ad 1000 ml Aqua dest.	

Potato Dextrose Broth (PDB)

6 g in 200 ml Aqua dest.

2.2.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Luria-Broth-Medium (LB-Medium)

Trypton 10 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 10 g
ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,0

Luria-Broth-Agar (LB-Agar)

Trypton 10 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 10 g
Agar-Agar 15 g
ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,0

2.2.2 Pflanzenanzucht

Vierkanttöpfe wurden mit einem Erdegemisch (Einheitserde Typ Topf 1,5 (Gebr. Patzer, Sinntal, Deutschland); C-Horizont; Sand im Verhältnis 5:4:1) befüllt und in jeden Topf acht Körner der Sommerweizen-Sorte Tybalt ausgesät. Die Anzucht erfolgt im Gewächshaus bei 18 – 20°C und einer Lichtperiode von sechzehn Stunden. Die auflaufenden Weizenpflanzen wurden alle zwei Tage bewässert und mit einem Holzstäbchen und Draht gestützt. Bei Erreichen des Zweiblattstadiums wurden die Pflanzen ausgedünnt, sodass nur noch zwei Pflanzen pro Topf weiter kultiviert wurden. Ab diesem Zeitpunkt wurde der Weizen einmal pro Woche mit 15 ml einer Wuxal-Lösung (0,2%) gedüngt und einmal protektiv mit dem Fungizid Fortress® (Quinoxifen, 500 g/l, 0,5 ml/ha) gegen eine Infektion mit Echtem Mehltau gespritzt.

Für die Experimente an Weizenblättern wurden die Pflanzen im Dreiblattstadium (BBCH 13) (Witzenberger et al. 1989; Lancashire et al. 1991) in eine Klimakammer gebracht (20-22°C bzw. 23-25°C, 16 h Photoperiode). Wurden allerdings die Ähren für die Untersuchungen eingesetzt, wurde der Weizen bis zum Stadium der Vollblüte (BBCH 65-69) im Gewächshaus kultiviert und erst für die Experimente in die Klimakammer gestellt (20-22°C, 16 h Photoperiode).

2.3 Chemikalien für mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen

Bioworld

Denhardt's 100x, Salmon Sperm DNA

Fermentas Molecular Biology Tools

*Bss*HII , *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Xba*I

Hexalabel Sonden Kit

Macherey und Nagel

Nucleo Spin Extract II Kits

Merck (Darmstadt)

Bactopecton, Hefeextrakt, Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Medium

Promega GmbH (Mannheim)

Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food

Qiagen (Hilden)

DNeasy Plant Mini Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit

Roth (Karlsruhe)

Agar-Agar, Acetonitril, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Essigsäure, Methanol, Trifluoressigsäure

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München):

Agarose, Ampicillin, CaCl₂, Caseinhydrolysat, Chitinase (#C-6137), Driselase (#D-9515), Glukose, Glycerin, HCl, Hygromycin B, KCL, KH₂PO₄, KNO₃, Lysing Enzyme aus *Trichoderma harzianum* (#L-1412), MgSO₄, Natriumcitrat, NaCl, Natriumdodecylsulfat (SDS), Na₂HPO₄, NaOH, PIPES, Polyethylen Glykol 8000, Saccharose, Sorbitol, Tris-HCl, Trypton, Tween[®] 20, Zitronensäure

2.4 Markierung von *Fusarium* spp. mit Reportergenen für fluoreszierende Proteine

2.4.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Bakterien aus den Glycerindauerkulturen wurden auf Platten mittels einer Impföse nach dem Dreizehnstrichverfahren (Bast 2001) auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 24 Stunden wurden 10 ml LB-Medium + 10 µl Ampicillin in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben mit einzelnen Kolonien dieser Bakterien beimpft und 12-16 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Die Präparation der Plasmide erfolgte nach dem Protokoll für das QIAprep Spin Miniprep Kit. Die Kulturen wurden bei 16000 x g und Raumtemperatur für drei Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Buffer P1 resuspendiert. Daraufhin wurden 250 µl Buffer P2 hinzugefügt der Ansatz durch Invertieren vermischt. Nach Zugabe von 350 µl Buffer N3 wurde die Probe erneut invertiert und bei 16000 x g für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep spin Säule gegeben und für 30-60 Sekunden zentrifugiert. Dann wurden 500 µl Buffer PB auf die Säule pipettiert und wiederum für 30-60 Sekunden zentrifugiert. Nach Zugabe von 750 µl Buffer PE folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 30-60 Sekunden. Zum vollständigen Trocknen der Membran wurde für eine Minute zentrifugiert und dann die Plasmid-DNA mit 50 µl MilliQ-Wasser nach einminütiger Inkubation mit einem Zentrifugationsschritt von einer Minute eluiert. Die Plasmide wurden anschließend bei -20°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2 Transformation von *Fusarium*-Isolaten

Für die Transformationen (verändert nach Kistler und Benny 1988) wurden die fünf Isolate der *Fusarium*-Arten *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* und *F. tricinctum* verwendet (Tab.1). Zu Beginn wurden 200 ml YEPD-Medium mit je 3 – 5 x 10⁶ frischen Konidien des jeweiligen Isolates inokuliert.

Yeast Extract Peptone Dextrose – Medium (YEPD-Medium)

Hefeextrakt	3 g
Bactopepton	10 g
Glukose	20 g (separat autoklavieren)
ad 1000 ml Aqua dest.	

Die Kulturen wurden über Nacht (10–12 h) bei 28°C und 175 rpm inkubiert. Das gebildete Myzel wurde mit einem Rundfilter (Schleicher & Schuell) abfiltriert und in 20 ml Protoplastierungslösung in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben gegeben.

Protoplastierungslösung

Driselase 500 mg
Chitinase 1 mg
Lysing Enzyme 100 mg
in 20 ml KCl suspendieren, sterilfiltrieren

Der Ansatz wurde bei 30°C und 80 rpm für circa drei Stunden inkubiert. Die Bildung der Protoplasten wurde stündlich mikroskopisch überprüft. Die auf diese Weise gewonnenen Protoplasten wurden mit Hilfe von Miracloth (Roth, Karlsruhe) abfiltriert und für fünf Minuten bei 1000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml STC-Puffer resuspendiert.

STC-Puffer

1,2 M Sorbitol
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM CaCl₂

Die Suspension wurde bei 1000 g und 4°C erneut für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde vorsichtig in 1000 µl STC-Puffer resuspendiert und eine Zählung der Protoplasten mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer vorgenommen. Zu 10 µg Plasmid-DNA wurden für die Transformationsmischung folgende Komponenten zugegeben:

100 µl STC-Puffer
50 µl 30% PEG 8000-Lösung
10⁷ Protoplasten

30 % PEG 8000-Lösung

30 % (w/v) Polyethylen-Glycol (Mr 8000)
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
0,5 mM CaCl₂ (sterilfiltrieren)

Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Plasmid-DNA hergestellt.

Die Transformationsmischung wurde bei Raumtemperatur für zwanzig Minuten inkubiert, anschließend 2 ml PEG 8000-Lösung zugegeben und der Ansatz erneut für fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml STC-Puffer wurden 600 µl des Transformationsansatzes in 15 ml Regenerationsmedium (ca. 50°C) transferiert und in eine Petrischale gegossen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl in diesem Transformationsansatz wurde eine Verdünnungsreihe der Kontrolle ohne Plasmid hergestellt.

Regenerationsmedium

Lösung 1 (250 ml):

- 0,1 % (w/v) Hefeextrakt
- 0,1 % (w/v) Caseinhydrolysat
- 1 % (w/v) Agarose

Lösung 2 (250 ml):

- Saccharose 137,5 g

(beide Lösungen separat autoklavieren)

Die Platten wurden über Nacht bei 23°C inkubiert und im Folgenden mit 15 ml Regenerationsmedium + 30 µl Hygromycin B (Stocklösung: 100 mg/ml) überschichtet. Sowohl die Kontrollplatten als auch die Ansätze, die der Lebendzellzahl-Bestimmung dienten, wurden mit Regenerationsmedium ohne Zusatz von Hygromycin B überschichtet. Die Transformationsansätze wurden im Dunkeln für 4–7 Tage bei 24°C inkubiert. Die auswachsenden Transformanten wurden mikroskopisch auf die Fähigkeit, das entsprechende Reportergen zu bilden, mit einem Leica DM 6000B Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) überprüft. Mit dem Filter I3 (BP 450-490 Excitation Filter, 510 nm Dichromatic Mirror, LP 515 Suppression Filter) erfolgte dies bei den EGFP-Transformanten, bei den DsRed-Transformanten hingegen der Filter N2.1 (BP 515-560 Excitation Filter, 580 nm Dichromatic Mirror, LP 590 Suppression Filter).

2.5 Molekularbiologischer Nachweis der Integration der Reportergene mittels eines Southern Blots

Die Durchführung eines Southern Blots ermöglicht zusätzlich zum mikroskopischen Beweis der Integration der Gene für die beiden fluoreszierenden Proteine, den molekularbiologischen Nachweis der erfolgreichen Transformation. Hierfür werden DNA-Fragmente, die in einem vorhergehenden Schritt mittels einer Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt

wurden, auf einer Nylonmembran fixiert. Im Folgenden können dann einzelne DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit, unter anderem, radioaktiv markierten Sonden spezifisch nachgewiesen werden. Für die Southern Blot-Analysen wurden von jeder Transformationsvariante jeweils drei der Klone ausgewählt, die bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine besonders intensive Fluoreszenz aufgewiesen hatten.

2.5.1 Herstellung der radioaktiven Sonden

Zur Herstellung der Hybridisierungssonden wurden die Plasmide pSM1 und pPgpd-DsRed (Abb. 1) mit unterschiedlichen Sätzen von Restriktionsenzymen verdaut. Das Plasmid pSM1 wurde zunächst mit dem Enzym *NotI* (10 u/μl) geschnitten. Das daraus resultierende DNA-Fragment (egfp + pPgpd-Promotor) wies eine Länge von ca. 1800 bp auf. Dieses wurde in einem weiteren Verdauungsschritt mit dem Enzym *NcoI* (10 u/μl) geschnitten. Das entstandene Fragment von ca. 800 bp wurde dann zur Herstellung der Sonde eingesetzt. Das Plasmid pPgpd-DsRed hingegen wurde in einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BssHII* (10 u/μl) geschnitten, wobei ein DNA-Fragment von 646 bp entstand, das dann als Sonde verwendet wurde.

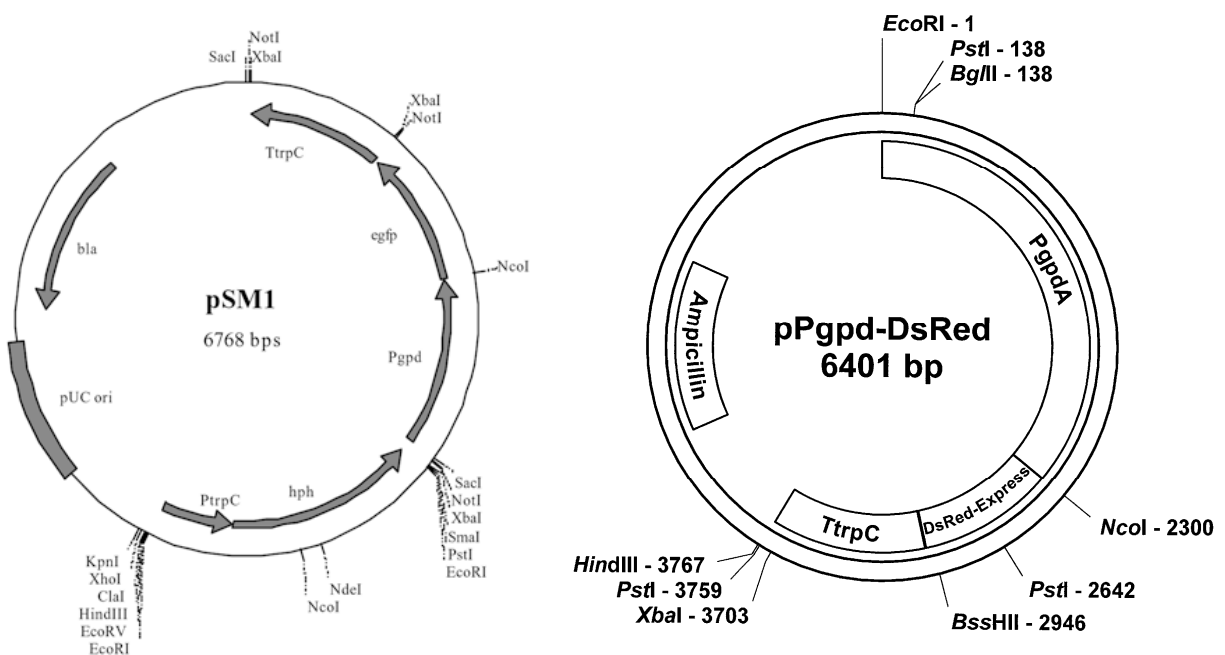


Abb. 2: Plasmide pSM1 und pPgpd-DsRed für die Herstellung radioaktiv markierter Sonden für Southern Blot-Analysen (Mikkelsen et al. 2003; Pöggeler et al. 2003)

Die radioaktive Markierung der beiden Sonden erfolgte nach dem Protokoll des Hexalabel Sonden Kits mit 32 Phosphor. Nach der Markierung wurden die Sonden über eine Sephadex G-

50-Säule nach dem Protokoll des Nucleo Spin Extract II Kits aufgereinigt um überschüssiges ^{32}P -dATP von den Sonden zu trennen.

2.5.2 Gelelektrophorese und Kapillarblot

Für den Southern Blot wurde die genomische DNA der EGFP-Transformanten der beiden *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* mit dem Restriktionsenzym *Xba*I (12 u/μl) verdaut, die der DsRed-Transformanten hingegen mit *Pst*I (10 u/μl). Als Negativkontrolle dienten die Wildtypen der beiden Pilzarten und wurden in getrennten Ansätzen mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wie die Transformanten.

5-10 μg der gespaltenen genomischen DNA wurden auf ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, und die Elektrophorese bei 80 V für ca. vier Stunden durchgeführt. Die Färbung des Gels erfolgte in 50 ml TAE 1x + 50 μl Ethidiumbromid für zehn Minuten auf einem Schüttler.

TAE 50x (Maniatis et al. 1982)

0,4 M Tris
0,01 M EDTA- Na_2 -Salz
0,2 M Essigsäure
pH 8,5

Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator fotografiert, zugeschnitten und ausgemessen. Anschließend wurde das Agarosegel für zehn Minuten in 0,2 M HCl depuriniert und dann zweimal für zwanzig Minuten in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH denaturiert. Die darauf folgende Neutralisation wurde in zwei Schritten von jeweils zwanzig Minuten in 1,5 M NaCl / 0,5 M TrisHCl (pH 7,5) durchgeführt. Auf jeden einzelnen dieser Schritte folgte ein Waschschritt mit Aqua dest.. Daraufhin wurde das Gel für dreißig Minuten in 20 x SSC inkubiert.

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0

Im Anschluss an diese Vorbehandlung erfolgte der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Roche, positively charged) mit Hilfe eines Kapillarblots (Maniatis et al. 1982). Der Blot wurde über Nacht durchgeführt und die Membran im Folgenden mit 6 x SSC für eine Minute gewaschen. Zum vollständigen Trocknen wurde die Nylonmembran eine Stunde lang bei

80°C getrocknet und dann für zwei Minuten auf einem UV-Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt, um eine Quervernetzung der DNA zu erreichen und sie so auf der Membran zu fixieren.

2.5.3 Hybridisierung der Membran

Die Prähybridisierung erfolgte in 10 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C für etwa dreißig Minuten in einem Universal-Hybridisierungsschrank APT.Line BFED der Binder GmbH, Tuttlingen.

Hybridisierungspuffer (50 ml)

ddH ₂ O	31,40 ml
4 M NaCl	7,5 ml
0,1 M PIPES	5 ml
0,5 M EDTA	100 µl
Denhardt's 100x	5 ml
10 % SDS	500µl
SS-DNA (10 µg/ml)	500µl

Die beiden Sonden wurden nach der radioaktiven Markierung und der anschließenden Aufreinigung bei 95°C denaturiert und vor dem Gebrauch zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte in 10 ml Hybridisierungspuffer, zu dem die jeweilige Sonde gegeben wurde, über Nacht im Hybridisierungsschrank. Nach der Hybridisierung wurde die Membran in mehreren Schritten bei Raumtemperatur gewaschen.

Waschpuffer 1 (2 x 5 Minuten)

2 x SSC + 0,1 % SDS

Nach diesem Waschschrift wurde mittels eines Geigerzählers die Signalintensität getestet. Da in der Regel noch zu starke Hintergrundsignale festzustellen waren, wurden weitere Waschschriffe durchgeführt.

Waschpuffer 2 (2 x 5 Minuten)

0,2 x SSC + 0,1 % SDS

Erneut wurde mittels eines Geigerzählers die Signalintensität bestimmt und die Membran im Falle zu starker Hintergrundsignale bei 65°C mit Waschpuffer 2 eventuell noch mehrere Male

gewaschen. Anschließend wurde die Nylonmembran über Nacht im Phospho-Imager-Screen exponiert. Das Strippen der Membran, also das Entfernen der spezifisch gebundenen Sonde als Vorbereitung für eine erneute Hybridisierung, erfolgte für zwei Stunden bei 65°C in Strip-Puffer.

Strip-Puffer

0,2 M NaOH

0,1 % SDS

Abschließend wurde die Membran fotografiert.

2.6 Inokulationstechniken

2.6.1 Herstellung von Inokulum

Um die für Inokulationen benötigte größere Menge an *Fusarium*-Konidien zu erhalten, wurden 200 ml PDB mit Stückchen von gut bewachsenen PDA-Platten aus Reinkulturen der jeweiligen Art beimpft. Die Kulturen in 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden für fünf Tage in einem Schüttler bei 120 rpm und 22°C im Dunkeln inkubiert. Von der so entstandenen Suspension aus Pilzmyzel und Nährmedium wurden 4 ml auf halbkonzentrierten PDA pipettiert. Während ein Großteil des Myzels auf der Agaroberfläche haften blieb, wurde das Flüssigmedium mit einer Pipette wieder entfernt. Nachdem die Platten unter der Sterilbank vollständig getrocknet waren, wurden sie ohne Parafilm-Verschluss für fünf Tage bei 21–23 °C unter Schwarzlicht inkubiert (Moradi 2008).

Zur Ernte der Konidien wurden die bewachsenen Platten mit 4 ml Aqua dest. überschichtet, die Sporen mit einem Drigalsky-Spatel abgeerntet und mit Hilfe von Verbandsmull filtriert, um größere Myzelstücke aus der Suspension zu entfernen. Mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Konzentration der *Fusarium*-Konidien ermittelt und eine Verdünnung mit sterilem Aqua dest. hergestellt, um die für die Experimente benötigten Konzentrationen zu erreichen.

2.6.2 Inokulation von Weizenblättern

Für die **Sprühinokulationen** wurde eine Konidienkonzentration von 1×10^6 Konidien/ml eingesetzt. Die Konidien suspension wurde mit einigen Tropfen (ca. 200 µl/50 ml) Tween® 20 versehen, um die Oberflächenspannung der Suspension herabzusetzen und damit ein zu starkes Abperlen der Flüssigkeit auf den Blättern zu verhindern. Die Blätter (Segmente von ca. 15 cm) wurden in einer Klimakammer auf einer Plexiglasschiene fixiert und dann mit einem Handsprüher inokuliert. Die Weizenpflanzen wurden für vierundzwanzig Stunden bei

einer Luftfeuchte von ca. 100% und ca. 20°C unter einer mit einem Holzgestell verstärkten Plastikhaube inkubiert. Die weitere Kultivierung der infizierten Pflanzen erfolgte bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50%. Als Negativkontrolle wurden Pflanzen mit Wasser inokuliert und wie die inokulierten Pflanzen inkubiert.

Bei **Punktinokulationen** wurden die auf den Plexiglasschienen fixierten Weizenblattsegmente mit Tropfen einer Konidiensuspension (1×10^5 Konidien/ml) inokuliert. Sechzehn Tropfen von jeweils 15 µl wurden mit Hilfe einer Multipette auf die Blattsegmente gegeben. Die Inkubation wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle diente Wasser.

2.6.3 Inokulation von Weizenähren

Die Weizenähren wurden im Stadium der Vollblüte (BBCH 65 - 69) inokuliert. Mit Hilfe einer Hamilton-Spritze wurden 10 µl einer Konidiensuspension (5×10^4 Konidien / ml) in die drei Ährchen auf jeder Seite der Ähre appliziert, die oberhalb der untersten beiden Ährchenpaare gelegen waren (Basis, s. Abb. 2). Die Pflanzen wurden für vierundzwanzig Stunden bei einer Temperatur von 20–22°C, einer Luftfeuchte von ca. 100 % und sechzehn Stunden Licht unter einer Plastikhaube und des Weiteren bei einer Luftfeuchte von ca. 50% in einer Klimakammer inkubiert. Als Kontrolle diente auch hier Wasser.

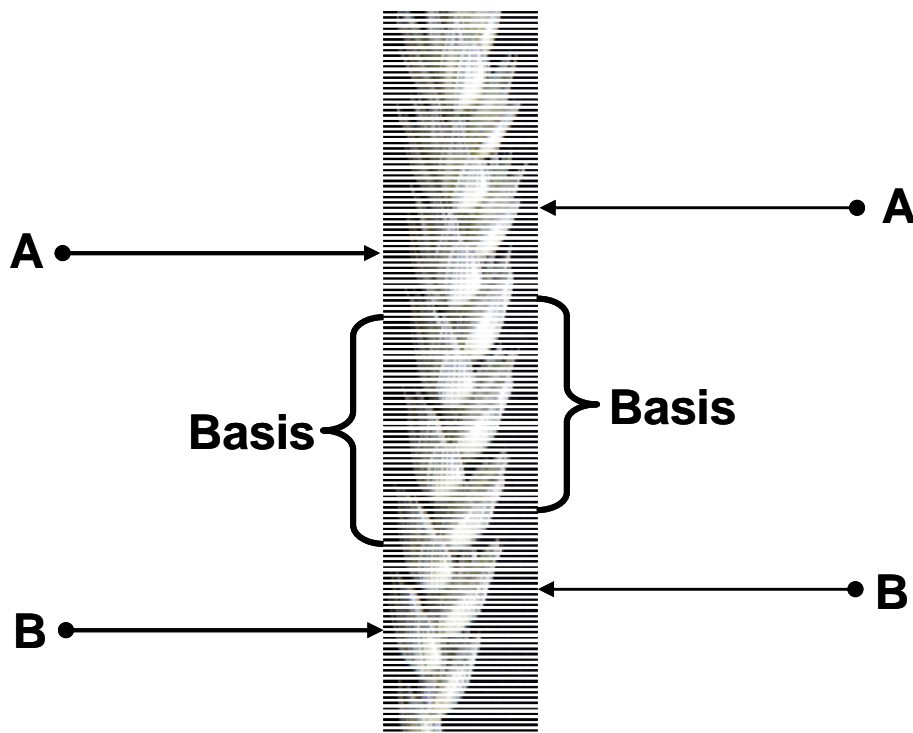


Abb. 3: Inokulationsschema für Weizenähren

2.7 Probenahme

Es wurden 0, 1, 3, 5 und 7 Tage nach der Inokulation der **Weizenblätter** Proben genommen. Bei den Probenahmen wurden jeweils drei inokulierte Blattsegmente zu einer Probe zusammengefasst und insgesamt sechs Proben pro Zeitpunkt und Variante genommen.

Pro Variante wurden jeweils sechs **Weizenähren** nach 0, 1, 2, 4, 7, 14 und 21 Tagen geerntet und gefriergetrocknet. Die Weizenähren wurden im Folgenden zerteilt. Das inokulierte Mittelstück bildete die Basis, während das nächstgelegene Ährchenpaar über der Basis mit A und das darunter liegende Paar mit B bezeichnet wurde (Abb. 2).

2.8 *In vitro*-Tests zu Wachstum und Sporulation

Da für weiterführende Experimente mit den transformierten *Fusarium*-Arten an der Wirtspflanze Weizen nur Transformanten verwendet werden sollten, deren Fitness sich durch die Insertion des Reportergens so wenig wie möglich gegenüber dem jeweiligen Wildtypen verändert hatte, wurden verschiedene Fitness-tests *in vitro* und *in situ* durchgeführt. Für diese Tests wurden abermals drei EGFP- und DsRed-Transformanten und die entsprechenden Wildtypen der beiden Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* verwendet.

2.8.1 Myzelwachstumstests

Das Wachstum der Wildtypen und der Transformanten wurde sowohl auf PDA als auch auf SNA untersucht. Hierzu wurden Platten mit 20 ml des jeweiligen Nährmediums gegossen und diese mit einem mit Myzel bewachsenen Agarstück von 5 mm Durchmesser, das in die Mitte der Agaroberfläche gesetzt wurde, beimpft. Die Kulturen wurden bei 22°C im Dunkeln inkubiert. Während eines Zeitraums von drei Tagen wurde täglich der Flächeninhalt der von dem Pilz bewachsenen Fläche bestimmt.

2.8.2 Sporulationstests

Um Aussagen über die Sporulation der Wildtypen und der Transformanten machen zu können, wurden Platten mit 20 ml SNA gegossen und diese ebenfalls mit einem Agarstück von 5 mm Durchmesser beimpft. Diese wurden wie in 2.7.1 beschrieben kultiviert und nach sieben Tagen mit sterilem Aqua dest. abgeerntet. Die Konzentration der Konidien wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt

2.8.3 Myzelwachstum unter Einfluss von Mykotoxinen

2.8.3.1 Mykotoxin-Filter-Test

PDA-Platten mit exakt 20 ml PDA wurden bei 37°C in einem Inkubator angewärmt. 5 ml noch flüssigen PDAs wurden in ein 12 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt und für einige Minuten in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 43°C gestellt. Im Folgenden wurde 6 ml PDA-Agar mit 10^6 Konidien von *F. avenaceum*, Isolat 1.15, und *F. graminearum*, Isolat 5.15, gründlich vermischt. Diese Mischung wurde auf eine der angewärmten PDA-Platten gegossen. Nach vollständiger Trocknung dieses sogenannten Schichtagars wurden drei Filterplättchen mit einem Durchmesser von 5 mm auf der Agaroberfläche ausgelegt und nach und nach mit 30 µl einer Deoxynivalenol- bzw. Nivalenol-Lösung ansteigender Konzentration (0,1 – 1 – 100 mg/ml) getränkt. Die Platten wurden bei 23°C inkubiert und das Wachstum der Pilze photographisch dokumentiert.

2.8.3.2 Mykotoxin-Test mit Agarstück

Zunächst wurde PDA mit einer Deoxynivalenol- bzw. Nivalenol- Konzentration von 10 mg/ml hergestellt. Die anfängliche Vorgehensweise bei diesem Experiment wurde in Abschnitt 2.11.1 bereits beschrieben, wobei hier eine Konidienkonzentration der beiden *Fusarium*-Isolate von 10^5 Konidien/ml eingesetzt wurde. Nach der Verfestigung des Agars wurden aus dem deoxynivalenol- bzw. nivalenolhaltigen Agar mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 5 mm) Agarstück ausgestochen und in die Mitte der Oberfläche des konidienhaltigen PDA gesetzt. Die Platten wurden bei 23°C inkubiert und die Entwicklung der *Fusarium*-Isolate dokumentiert.

2.8.4 Myzelwachstum unter Einfluss von Ferulasäure

Für Wachstumstests auf mit Ferulasäure versetztem Agar wurde zunächst eine Stocklösung hergestellt.

Stocklösung Ferulasäure (25 mg/ml)

1,25 g Ferulasäure in 50 ml 100%igem Ethanol

Es wurden 0, 0,5, 1, 2, 4 und 8 ml der Ferulasäure-Stocklösung in separate 15 ml-Tubes gegeben, mit 100%igem Ethanol auf 8 ml aufgefüllt und zu jeweils 500 µl 1/5 PDA + 10 ml McIlvaine's Puffer (150 mM Stocklösung, 1:100) hinzugefügt.

1/5 PDA

4,8 g/l PDB

15 g/l Agar

McIlvaine`s Puffer

Lösung A: 0,1 M Zitronensäure

Lösung B: 0,2 M Na₂HPO₄

pH 6,0 (sterilfiltrieren)

Nach dem Gießen und Abtrocknen der Platten wurden diese mit bewachsenen Agarstückchen (Korkbohrer-Durchmesser: 5 mm) von *F. avenaceum*, Isolat 1.15, dessen EGFP-Transformanten, *F. graminearum*, Isolat 5.15 und dessen DsRed-Transformanten beimpft. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei 23°C wurde der Radius der gewachsenen Kolonien gemessen.

2.9 Molekularbiologische Untersuchungen

2.9.1 DNA-Extraktion

Im Zuge dieser Arbeit war es nötig sowohl aus reinem Pilzmyzel als auch aus unterschiedlichen mit *Fusarium* spp. infizierten Matrices (Weizenblättern und -körnern) DNA zu extrahieren.

2.9.1.1 DNA-Extraktion aus *Fusarium*-Myzel

Für die Herstellung der Standards, die für die quantitative Bestimmung des DNA-Gehalts in unterschiedlichen Weizenproben mittels TaqMan[®] Real-time PCR benötigt wurden, wurde DNA aus Reinkulturen der jeweiligen *Fusarium*-Wildtypen extrahiert. Zu diesem Zwecke wurden die Pilzisolat für fünf Tage in PDB-Flüssigmedium in 500 ml-Erlenmeyerkolben bei 120 rpm und 22°C inkubiert. Die Kulturen wurden im Folgenden mit Hilfe einer Vakuumpumpe abfiltriert und in 2ml-Reaktionsgefäße transferiert. Das Pilzmyzel wurde eine Stunde lang bei -80°C vorgekühlt und dann für vierundzwanzig Stunden gefriergetrocknet. Zu dem getrockneten Myzel wurden zwei bis drei Stahlkugeln mit einem Durchmesser von 2 mm gegeben und dieses für drei Minuten bei 2000 rpm in einem Mikro-Dismembrator (B. Braun Biotech International) zu einem sehr feinen Mehl zermahlen.

Für die Extraktion der DNA mit dem DNeasy Plant Mini Kit wurden 20 mg dieses Mehls in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Lysis Buffer AP1 und 4 µl RNase Stocklösung (100 mg/ml) zugegeben. Die Bestandteile wurden auf dem Vortex gründlich vermischt und der Ansatz für zehn Minuten bei 65°C im Heizblock unter gelegentlichem

Invertieren inkubiert. Zu dem Lysat wurden 130 µl Buffer AP2 hinzugefügt, erneut gemischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde dieses für fünf Minuten bei 16000 x g, mittels einer Pipette in ein QIAshredder Mini spin Säule in einem 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend erneut bei 16000 x g für zwei Minuten abzentrifugiert. Ohne das Zelldebris – Pellet zu beschädigen, wurde der Durchfluss in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 1,5 Volumenteilen Buffer AP3/E zu dem klaren Lysat hinzugefügt. Von der Probe wurden 650 µl auf eine DNeasy Mini spin Säule in einem 2 ml – Sammel tube pipettiert und bei 16000 x g für eine Minute erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Rest der Probe wiederholt und die DNeasy Mini spin Säule in ein neues Sammel tube (2 ml) gestellt. 500 µl Buffer AW wurden auf die Säule gegeben, und der Ansatz für eine Minuten bei 16000 x g abzentrifugiert.

Der Vorgang wurde wiederholt, wobei die Dauer des Zentrifugationsschrittes auf zwei Minuten erhöht wurde, um die Membran vollständig zu trocknen. Die DNeasy Mini spin Säule wurde in ein neues Eppendorf–Tube (1,5 ml oder 2 ml) gestellt und 100 µl Buffer AE direkt auf die DNeasy Membran pipettiert. Der Ansatz wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur (15–25°C) inkubiert und dann für die Elution der DNA aus der Membran für eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Die extrahierte DNA wurde bei -20°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.9.1.2 DNA-Extraktion aus Weizenblättern

Im Zuge einer Versuchsreihe wurde DNA aus Blattmaterial von Weizen extrahiert. Jeweils drei Blattsegmente wurden nach vierundzwanzigstündiger Gefriertrocknung zunächst mit Hilfe eines Spatels zu einem feinen Pulver zermahlen. Für die Extraktion wurden 20 mg Blattmaterial eingesetzt. Diese wurde ebenfalls mit dem DNeasy Plant Mini Kit durchgeführt, wobei allerdings in den ersten Schritten des Herstellerprotokolls geringfügige Änderungen vorgenommen wurde. Zunächst wurde die zuzugebende Menge an Lysis Buffer AP1 auf 600 µl erhöht und entsprechend dann auch 6 µl RNase Stocklösung (100 mg/ml). Zu diesem Ansatz wurde eine Spatelspitze Polyvinylpyrrolidon (PVP) hinzugefügt. Dieses setzt aufgrund der Tatsache, dass es Polyphenole, sekundäre Pflanzenstoffe, bindet, die Viskosität des Gemisches herab und erleichtert damit die weitere Verarbeitung. Entsprechend der Erhöhung der zugegebenen Menge an Lysis Buffer AP1 wurden 195 µl Buffer AP2 hinzugefügt. Im Folgenden wurde dann nach dem in Absatz 2.9.1.1 schon aufgeführten Protokoll verfahren.

2.9.1.3 DNA-Extraktion aus Weizenähren

Nach Inokulation von Weizenähren wurden an den schon genannten Zeitpunkten Proben genommen. Diese wurden für etwa eine Stunde bei -80°C vorgekühlt und dann dreißig Stunden lang gefriergetrocknet. Daraufhin wurden die Ähren in das Basisstück und die Teilstücke A und B aufgeteilt und in einer Kugelmühle der Firma Retsch (MM 200) für drei Minuten bei 30 s^{-1} zermahlen.

Die genomische Pilz-DNA wurde mit Hilfe des Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) extrahiert. Je Probe wurden zunächst 20 mg des gemahlenen Materials in ein 2 ml-Reaktionsgefäß abgewogen. Nach Zugabe von 400 µl Lysis Buffer A und 4 µl RNase A wurde der Ansatz durch Vortexen gründlich vermischt, bis eine homogene Verteilung des Weizenmehls eingetreten war. Anschließend wurden 200 µl Lysis Buffer B zugegeben, erneut gründlich vermischt und die Probe bei Raumtemperatur für zehn Minuten unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Im Folgenden wurden 600 µl Precipitation Solution hinzugefügt und wiederum durch Vortexen gemischt. Der Ansatz wurde dann für zehn Minuten bei $16000 \times g$ zentrifugiert und der klare Überstand in ein sauberes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden 50 µl MagneSil[™] PMPs und 800 µl Isopropanol gegeben und das Ganze bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und gelegentlich invertiert. Das Reaktionsgefäß wurde in einen MagneSphere[®]-Ständer gestellt und nach einminütigem Ruhen wurde die Flüssigkeit ausgeschüttet, während die Magnetkügelchen, an den die DNA haftete, im Reaktionsgefäß verblieben. Nachdem die Probe aus dem MagneSphere[®]-Ständer herausgenommen worden war, wurde sie nach Zugabe von 250 µl Lysis Buffer B und fünfmaligem Schwenken erneut in diesen hineingestellt und nach einminütigem Ruhen entleert. Danach wurden 1000 µl Waschlösung in Form von 70%igem Ethanol hinzugegeben und die DNA gewaschen, indem das Reaktionsgefäß in dem MagneSphere[®]-Ständer mehrere Male um 180° gedreht wurden, so dass die Magnetkugeln durch die Waschlösung zu der gegenüberliegenden Gefäßwand gezogen wurden. Die Waschlösung wurde ausgeschüttet und der Vorgang zweimal wiederholt. Mit einer Pipette wurde anschließend so viel Flüssigkeit wie möglich aus dem Reaktionsgefäß entfernt und dieses geöffnet im MagneSphere[®]-Ständer für zehn Minuten bei 65°C zur Trocknung der Probe in einen Heizofen gestellt. Im Folgenden wurden 200 µl MilliQ-Wasser zugegeben, gründlich gemischt und der Ansatz für fünf Minuten bei 65°C im Heizblock inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde erneut in den MagneSphere[®]-Ständer gestellt und die Flüssigkeit ohne die Magnetkügelchen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die extrahierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.9.2 TaqMan® Real-time Polymerase Chain Reaction

Die Quantifizierung der pilzlichen Biomasse in Weizenblättern und -körnern erfolgte mittels einer quantitativen Echtzeit-Detektions-PCR (Real-time PCR) basierend auf dem TaqMan® System.

2.9.2.1 Eichstandards

Die Konzentration der genomischen Wildtyp-DNA, die wie in Abschnitt 2.9.1.1 beschrieben für die Erstellung einer Eichreihe isoliert worden war, wurde mit einem BioPhotometer plus der Firma Eppendorf mittels der Messung der optischen Dichte bestimmt. Daraufhin wurden für *F. avenaceum* und *F. graminearum* Eichreihen von 9000 pg/µl, 900 pg/µl, 90 pg/µl und 9 pg/µl hergestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.9.2.2 Plasmid-Präparation der internen PCR-Kontrolle

Aus einer Dauerkultur des Potato Leaf Roll Virus (PLRV)-tragenden *Escherichia coli* bei einer Temperatur von -80°C wurde unter der Sterilbank Material entnommen und mit dem Dreizehnstrich-Verfahren auf einer LB-Platte ausgestrichen. Nach einer Inkubation von achtundvierzig Stunden bei 37°C wurde mit einer Pipettenspitze eine vereinzelte Kolonie von *E. coli* abgeimpft und in 5 ml LB-Medium in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Die Kultur wurde für etwa zwölf Stunden bei 350 rpm und 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Präparation des Plasmids erfolgte nach dem Protokoll für das QIAprep Spin Miniprep Kit (s. 2.4.1). Das Plasmid wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.9.2.3 Durchführung der TaqMan® Real-time PCR

Nach Waalwijk et al. (2004) setzte sich ein Reaktionsansatz von insgesamt 30 µl sowohl für *F. avenaceum* als auch für *F. graminearum* wie folgt zusammen: 15 µl 2xTaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI, Foster City, USA), 333 nM jedes Target-Primers, 83 nM der Target-Sonde, 1 µl PLRV-DNA (100 pg/µl), 333 nM jedes PLRV-Primers, 83 nM der PLRV-Sonde, 7 µl Wasser und 2 µl der zu analysierenden Probe (Waalwijk et al. 2004). Die TaqMan® Real-time PCR wurde in einem ABI 7500 Fast Real-time Thermocycler (ABI, Foster City, USA) im Standard-Modus durchgeführt. Das Temperaturprofil bestand aus einem Initialschritt von zwei Minuten bei 50°C und einem Aktivierungsschritt der Taq-Polymerase von zehn Minuten bei 95°C, gefolgt von vierzig Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt von fünfzehn Sekunden bei 95°C und einem Annealing- und Extensionsschritt von sechzig Sekunden bei 60°C. Die verwendeten Sonden waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff FAM markiert, wohingegen der Quencher als Blackhole-Quencher vorlag (Waalwijk et al. 2004).

Tab. 2: Primer und Sonden für die TaqMan® Real-time PCR (Waalwijk et al. 2004)

<i>Fusarium</i> -Art	Primer/Sonde	Sequenz (5'→3')	Amplikon-Größe (bp)
<i>F. avenaceum</i>	<i>avenaceum</i> MGB-F	CCATCGCCGTGGCTTTC	58
	<i>avenaceum</i> MGB-R	CAAGCCCACAGACACGTTGT	
	<i>avenaceum</i> MGB-Sonde	ACGCAATTGACTATTGC	
<i>F. graminearum</i>	<i>graminearum</i> MGB-F	GGCGCTTCTCGTGAACACA	94
	<i>graminearum</i> MGB-R	TGGCTAAACAGCACGAATGC	
	<i>graminearum</i> MGB-Sonde	AGATATGTCTCTTCAAGTCT	

Die Quantifizierung der beiden *Fusarium*-Arten wurde in MicroAmp™ Fast Optical 96-Wells Reaction Plates mit Hilfe eines Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System (ABI, Foster City, USA) durchgeführt. Für jede PCR wurden Eichreihen mit den Konzentrationen 9000 pg/μl, 900 pg/μl, 90 pg/μl und 9 pg/μl für die jeweilige Target-DNA erstellt und diese ebenso wie Proben und Negativkontrollen dreifach bestimmt. Die Amplifizierung und Quantifizierung des PLRV als interne PCR-Kontrolle diente in jedem Reaktionsansatz dazu, die Negativkontrollen zweifelsfrei von PCR-Inhibitoren unterscheiden zu können.

Die in dem Gerät integrierte Software (SDS Programm, ABI, Foster City, USA) wurde zur Auswertung hinzugezogen, wobei in jedem Ansatz anhand der erstellten Standardkurven die in der jeweiligen Probe enthaltene Ausgangsmenge an Target-DNA absolut quantifiziert wurde. Die Kurven setzten sich aus vier Konzentrationen einer Verdünnungsreihe zusammen und wurden durch das Auftragen der ermittelten Threshold-Cycle-Werte der Eichstandards gegen den Logarithmus ihrer Konzentration als Regressionsgerade dargestellt. Eine auswertbare Real-time PCR wurde durch eine Effizienz der Amplifikation zwischen 90 und 110% definiert. Die ideale Steigung der Standardgeraden lag im Falle von *F. avenaceum* bei -3,32 und von *F. graminearum* bei -3,47. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Standardgeraden sollte $> 0,99$ sein. Der arithmetische Mittelwert, der sich aus den in drei Wiederholungen ermittelten DNA-Mengen zusammensetzte, wurde zur Berechnung der Ausgangsmenge an Target-DNA in einer Probe nach folgender Formel verwendet:

$$\text{DNA-Menge [pg/mg Trockenmasse]} = [(MW/2)/20]*100$$

Diese Formel ergibt sich aus der in die PCR-Reaktion eingesetzten DNA-Menge einer Probe (2 μl), der Menge des für die DNA-Extraktion benötigten Ausgangsmaterials (20 mg) und dem am Ende der Extraktion erreichten Endvolumen (100 μl).

2.10 Multimykotoxinanalyse

Die Analysen der Mykotoxine wurden am Institut für Umweltforschung (INFU) an der Universität Dortmund mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) (Herebian et al. 2009) durchgeführt. Mit dieser Methode können insgesamt zweiunddreißig Mykotoxine nachgewiesen werden.

Tab. 3: Mittels Multimykotoxin-Analyse nachweisbare Mykotoxine und Nachweisgrenzen (verändert nach Herebian et al. 2009)

Mykotoxin	Nachweisgrenze [ng/g]
3-Acetyldeoxynivalenol	10
15-Acetyldeoxynivalenol	10
Aflatoxin B1	0,5
Aflatoxin B2	30
Aflatoxin G1	1
Aflatoxin G2	10
Altenuen	1
Alternariol	1
Alternariolmethylether	1
Beauvericin	0,5
Citrinin	10
Deoxynivalenol	12
Diacetoxyscirpenol	10
Enniatin B	2
Ergocornin	0,5
Ergotamin	1
Fumonisin B1	35
Fumonisin B2	30
Fusarenon-X	15
Gibberellinsäure	10
HT2-Toxin	8
Moniliformin	12
Monoacetoxyscirpenol	10
Neosolaniol	15
Nivalenol	12
Ochratoxin A	4
Ochratoxin B	1
Patulin	800
T2-Toxin	1
Verrucarin	1
α -Zearalenol	4
Zearalenon	4

Für die Analysen wurden 50 mg des schon für die Real-time PCR verwendeten Blattmaterials und 200 mg der gemahlenen Weizenkörner eingesetzt. Zu dem homogenisierten Weizenmehl wurde nach Zugabe der internen Standardlösung ein Acetonitril/Wasser/Essigsäure-Gemisch (79:20:1, v/v/v) gegeben und die Extraktion erfolgte innerhalb eines Zeitraums von neunzig Minuten auf einem Rotationsschüttler. Nach einem Zentrifugationsschritt von drei Minuten wurde der Überstand injiziert. Zur Analyse der Extrakte mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) wurde eine C18-Säule und zur Gradientenelution Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisch (10:89:1, v/v/v) sowie Methanol /Wasser/Essigsäure-Gemisch (97:2:1, v/v/v) eingesetzt. Die Messungen wurden mit einem TSQ Quantum Ultra AM Massenspektrometer (Thermo Finnigan) durchgeführt, wobei zur Trocknung und Zerstäubung Stickstoff eingesetzt wurde.

2.11 Extraktion und Detektion von Ferulasäure

Sowohl aus dem unbewachsenen Außenbereich als auch aus dem kolonisierten Innenbereich der Platten aus dem Wachstumstest (s. Abschnitt 2.8.4) wurde ein Stück Agar von etwa 200 mg entnommen, dieses in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und das genaue Gewicht notiert. Des Weiteren wurde das dreifache Volumen an Ethanol absolut zugeben und die Ansätze über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 2300 x g wurden die Proben sterilfiltriert (0,45 µm, Sarstedt, Nümbrecht) und etwa 300 µl in HPLC-Polypropylen-Probenflaschen pipettiert.

Die Detektion des Ferulasäure-Abbaus erfolgte mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) mit einem Hewlett Packard (HP) System unter Anwendung einer LiChrospher®C18 Reversed-Phase-Vorsäule (4.0 mit 4.0 mm, 5 µm) gefolgt von einer LiChrospher®C18 RP-Säule (250 mit 4.0 mm, 5 µm). Das HPLC-System bestand aus einem HP1050 Entgaser, einer HP1050 Pumpe, einem HP 1050 Diodenarraydetektor (DAD), einem HP 1046A Fluoreszenzdetektor (FD) und einem HP 1050 Probengeber. Bevor die Proben eingespritzt wurden, wurde die Säule mit 90% (v/v) Wasser + 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) (Solvent A) und 10% Acetonitril (Solvent B) equilibriert. Nach der Injektion der Proben wurden die Proben mit einer Flussrate von 1.0 ml/min unter Anwendung eines isokratischen Flusses von 90% Solvent A und 10% Solvent B für zwei Minuten, eines linearen Gradienten zu 10% Solvent A und 90% Solvent B für achtundzwanzig Minuten, gefolgt von einem isokratischen Fluss mit 90% Solvent B für fünf Minuten eluiert. Bevor die nächste Probe eingespritzt wurde, wurde erneut ein linearer Gradient von 90% Solvent A und 10% Solvent B zur Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen eingestellt. Zur Berechnung der Konzentration der Ferulasäure wurde eine Eichreihe erstellt.

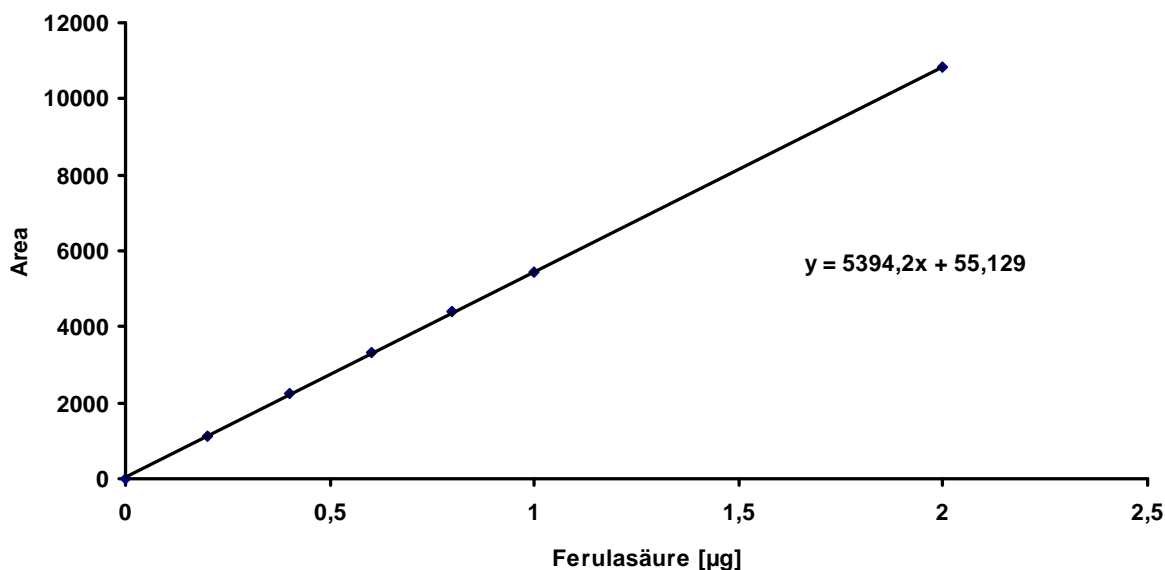


Abb. 4: Eichreihe für die Berechnung der Ferulasäure-Konzentrationen

2.11.1 Isolation von Ferulasäure aus Weizenähren

2.11.1.1 Isolation löslicher Ferulasäure

Von allen drei Teilstücken der Weizenähren (A, Basis, B, s. Abb. 2) wurden 50 mg des Mehls abgewogen. Diese wurden mit 1 ml Methanol versetzt und etwa zwölf Stunden auf einem Schüttler bei 350 rpm und Raumtemperatur inkubiert (Laokuldilok et al. 2011). Die Proben wurden danach bei 2300 x g drei Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (0,45 µm, Sarstedt, Nümbrecht). Die Analyse erfolgte mittels HPLC nach dem in Abschnitt 2.12.2 bereits aufgeführten Protokoll.

2.11.1.2 Isolation zellwandgebundener Ferulasäure

Für diese Isolation wurden 50 mg der gemahlenen Weizenähren in ein Rundröhrchen abgewogen und 2 ml 4 M NaOH hinzupipettiert (geändert nach McKeehen et al. 1999). Die Ansätze wurden für zwei Stunden auf einem Schüttler bei 350 rpm und Raumtemperatur inkubiert, woraufhin im Anschluss die Proben auf Eis gestellt wurden und 1 ml eiskalte 32%ige HCL (w/v) zugeben wurde, wobei der pH-Wert der Proben nun zwischen 1 und 2 liegen sollte. Im Folgenden wurde die Ferulasäure durch die schrittweise Zugabe von Ethylacetat extrahiert. Hierfür wurde der Ansatz mit 5 ml Ethylacetat versetzt, mit einem Vortex kräftig vermischt und für drei Minuten bei 2300 x g abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein 50 ml-Falcontube gegeben. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt und alle Überstände gesammelt.

Der Gesamtextrakt von 15 ml wurde mit Luftzufuhr mittels eines Techne Sample Concentrators getrocknet und das zurückgebliebene Pellet in 1 ml Methanol aufgenommen, sterilfiltriert (0,45 µm, Sarstedt, Nümbrecht) und mit HPLC analysiert.

2.12 Mikroskopische Techniken

2.12.1 Stereomikroskopie

Für die stereomikroskopischen Aufnahmen der Krankheitssymptome an mit *Fusarium* spp. infizierten Weizenblätter und -ähren wurde ein Leica MZ 16F Stereomikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden ohne Vorbehandlung untersucht und mit Hilfe einer Digital Camera KY-F75U und der Software Diskus photographisch festgehalten.

2.12.2 Fluoreszenzmikroskopie

Ein Leica DM 6000B Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurde für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verwendet. Der Filter I3 (BP 450-490 Excitation Filter, 510 nm Dichromatic Mirror, LP 515 Suppression Filter) diente der Untersuchung der mit EGFP markierten Objekte, wohingegen der Filter N2.1 (BP 515-560 Excitation Filter, 580 nm Dichromatic Mirror, LP 590 Suppression Filter) für die Visualisierung von DsRed eingesetzt wurde.

2.12.3 Konfokale Laser-Mikroskopie

Um den Infektionsverlauf durch *F. avenaceum* und *F. graminearum* im Weizengewebe verfolgen zu können, wurden mit Hilfe eines Vibratoms Leica VT 1200S (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) Dünnschnitte (120-150 µm) von Ährchen gemacht, die mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* oder einer Kombination aus beiden inokuliert worden waren. Diese Präparate wurden dann ohne jegliche weitere Behandlung mit einem Konfokallaser-Mikroskop (Olympus BX61) untersucht und mit der Software Olympus Fluoview, Version 3.0 photographisch dokumentiert.

2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Mit dem Kolmogoro-Smirnov-Anpassungstest wurden die Daten auf Normalverteilung und mit dem Levene-Test auf Varianzhomogenität überprüft. Für den Fall, dass beide gegeben waren, wurden die Daten bei mehr als zwei Stichproben mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$) verrechnet. Unterschiede

zwischen zwei Mittelwerten wurden mit dem t-Test und bei mehr als zwei Untergruppen mit dem Tukey-Test bestimmt. Lag keine Normalverteilung vor wurde bei mehr als zwei Stichproben der Kruskal-Wallis-Test und bei Unterschieden zwischen zwei Mittelwerten der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Wenn mehr als zwei Stichproben verglichen wurden, wurden signifikante Unterschiede mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet. Unterschiede zwischen zwei Stichproben wurden mit Sternchen markiert (* $0,01 \leq p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). In den Abbildungen wurden Mittelwerte (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angezeigt.

3 Ergebnisse

Die weltweit im Getreideanbau auftretende Partielle Taubährigkeit an Weizen wird durch einen Erregerkomplex aus der Gattung *Fusarium* hervorgerufen. Da demzufolge also gleichzeitig mehrere Arten an der gleichen Pflanze zu finden sind, kommt es vermutlich zu Wechselwirkungen zwischen den Pilzen. Über die Art und Weise der gegenseitigen Beeinflussung ist allerdings bisher nur wenig bekannt. Da es ausgesprochen schwierig ist, Hyphen der unterschiedlichen *Fusarium*-Arten unter dem Mikroskop ohne Hilfsmittel wie zum Beispiel Färbungen zu unterscheiden, wurden verschiedenen Arten dieser Ascomyceten-Gattung mit den Genen für fluoreszierende Proteine transformiert. Die Markierung von Pilzen mit fluoreszierenden Proteinen diente hier *in vitro* und *in situ* als Werkzeug, um das Studium von Prozessen und Interaktionen im Pflanzengewebe ohne vorherige Fixierung des Materials oder Substratzugabe zu ermöglichen.

3.1 *Fusarium* spp. markiert mit Reporterproteinen

3.1.1 Erhalt von transformierten *Fusarium* spp.

Um verschiedene *Fusarium*-Arten unterscheiden und mögliche Interaktionen erkennen zu können, wurden fünf Isolate der filamentösen Ascomyceten-Arten *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* und *F. tricinctum* mittels Protoplasten-Transformation mit den Reportergenen EGFP und DsRed-Express transformiert. Ein primäres Screening der Transformanten erfolgte mit Hilfe des Selektionsantibiotikums Hygromycin. Schon nach wenigen Tagen waren gegen Hygromycin resistente Transformanten ausgewachsen, die entweder das grünfluoreszierende EGFP oder das rotfluoreszierende DsRed-Express exprimierten. Die Anzahl der hygromycinresistenten Protoplasten, die sich bei Wachstum auf dem Selektivmedium regenerierten, unterschied sich zwischen den beiden Arten (Tab. 4).

Tab. 4: Prozentualer Anteil von hygromycinresistenten Transformanten nach Plasmid-Transformation von *Fusarium*-Protoplasten

Art	Hygromycinresistente Transformanten/ μ g DNA	EGFP-Transformanten	DsRed-Transformanten
<i>Fusarium avenaceum</i>	30-40	10-15	1-8
<i>Fusarium culmorum</i>	40-50	20-30	/
<i>Fusarium graminearum</i>	60-70	40-50	8-10
<i>Fusarium poae</i>	60-70	30-40	/
<i>Fusarium tricinctum</i>	20-25	5-10	/

Infolge der Transformation von *F. avenaceum* mit EGFP wiesen etwa 30% der gegen das Antibiotikum resistenten Klone auch eine Expression des Reportergens auf, bei Transformation mit DsRed-Express etwa 10%. Diese Prozentsätze lagen bei der Transformation von *F. graminearum* mit EGFP mit etwa 70% und etwa 54% bei Anwendung von DsRed-Express deutlich höher als im zuvor erwähnten Fall. Bei allen Transformationsansätzen wies eine höhere Anzahl an Transformanten eine Hygromycinresistenz auf, enthielt also das jeweilige Plasmid, exprimierte hingegen aber nicht das in dem Vektor enthaltene Reportergen.

3.1.2 Effizienz der Transformation

Generell wurden 10^7 Protoplasten und 10 µg Plasmid-DNA für jeden Transformationsansatz eingesetzt. Die Überlebensrate der Protoplasten betrug ungefähr 70%. Die Plasmide wurden in linearisierter Form zufällig in das Genom des jeweiligen Pilzisolates integriert. Bei Transformation mit dem Vektor pSM1 betrug die Transformationseffizienz 9-12 Transformanten (*F. avenaceum*) und 25-30 Transformanten (*F. graminearum*) pro 10^7 Protoplasten. Die Effizienz bei Transformation mit pPgpd-DsRed lag mit 1-3 Transformanten (*F. avenaceum*) und 8-10 Transformanten (*F. graminearum*) pro 10^7 Protoplasten deutlich niedriger.

3.1.3 Expression der Reporterproteine in *Fusarium* spp.

Die Expression der fluoreszierenden Proteine in den hygromycinresistenten Rekombinanten der fünf *Fusarium*-Arten wurde mikroskopisch an einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Sowohl bei den EGFP-Transformanten als auch bei den DsRed-Transformanten konnte die Bildung der beiden Reporterproteine nachgewiesen werden (Abb. 3).

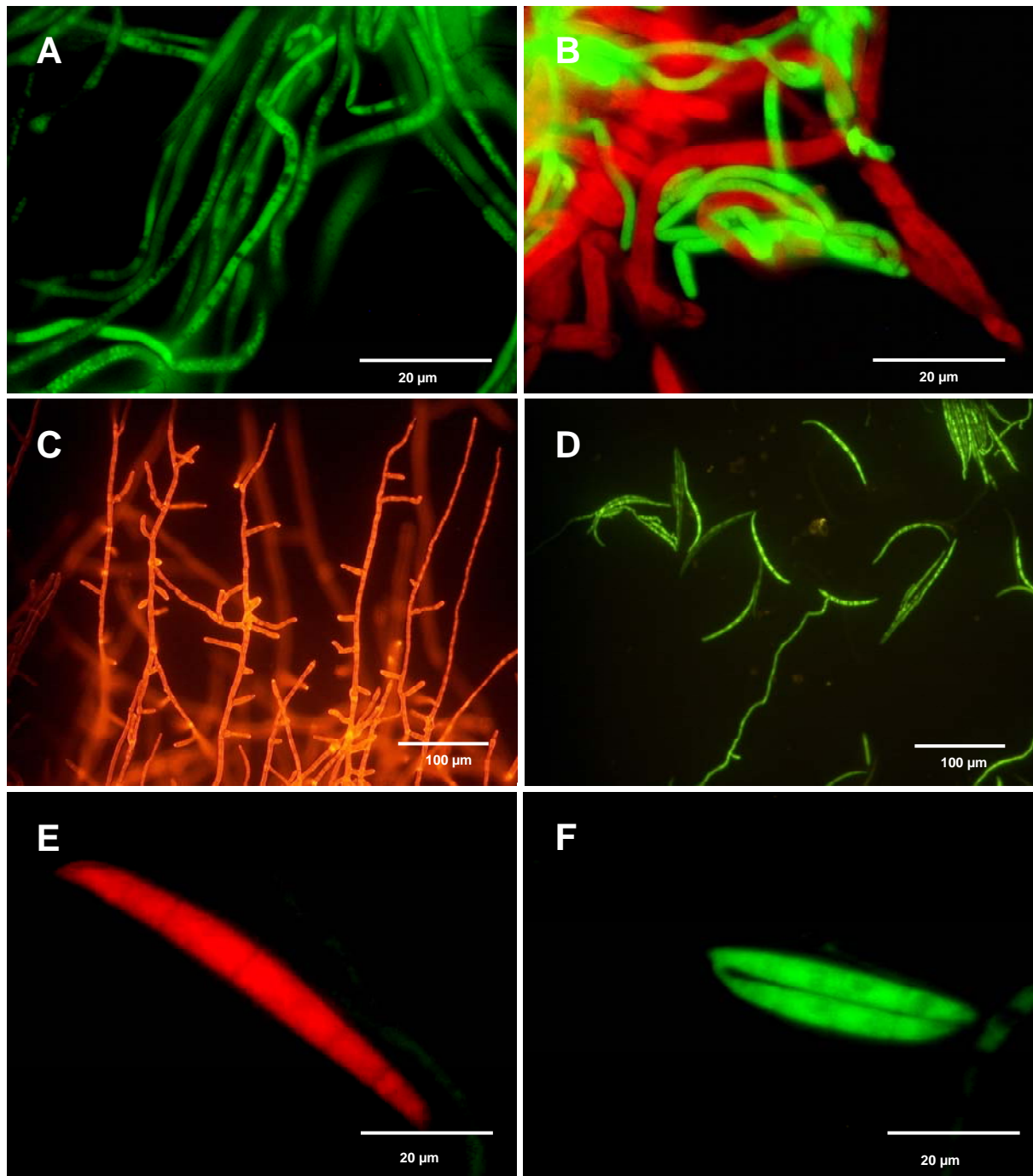


Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression der Reportergene EGFP und DsRed in Myzel und Makrokonidien der *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum*, (A) Myzel eines EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, (B) Hyphen eines EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und eines DsRed-Transformanten von *F. graminearum*, (C) Myzel eines DsRed-Transformanten von *F. graminearum*, (D) Makrokonidien eines EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, zum Teil Ausbildung von Keimschläuchen erkennbar, (E) Makrokonidie eines DsRed-Transformanten von *F. graminearum*, (F) Makrokonidie eines EGFP-Transformanten von *F. graminearum*

In allen Fällen funktionierten der starke, konstitutive *gpd*-Promotor aus *Aspergillus nidulans* und die Expression der fluoreszierenden Proteine hocheffizient. Die Anwesenheit von EGFP und DsRed-Express war sowohl in den Hyphen als auch in den Konidien der Pilze zu beobachten (Abb. 5). An Hyphen und Konidien waren keine morphologischen Veränderungen zu erkennen.

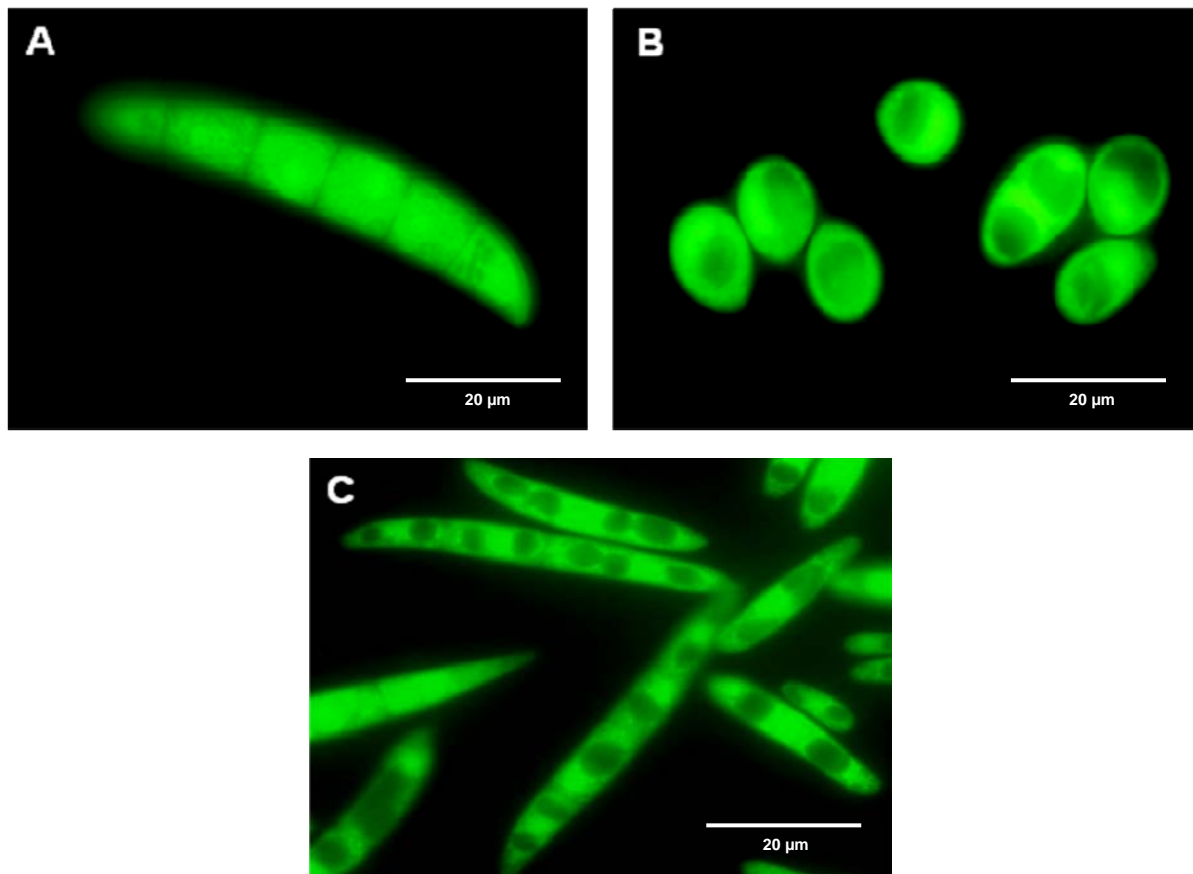


Abb. 5: EGFP exprimierende Mikro- und Makrokonidien von *Fusarium* spp. (A) Makrokonidien von *F. culmorum*, (B) Mikrokonidien von *F. poae*, (C) Makrokonidien von *F. tricinctum*

Alle Konidien einer das jeweilige fluoreszierende Protein exprimierenden Kolonie produzierten EGFP oder DsRed-Express. Auch das Auskeimen der Makrokonidien konnte mit Hilfe der auch in den Keimschläuchen sofort zu erkennenden Fluoreszenz beobachtet werden. Innerhalb der Hyphen wiesen die Reporterproteine unabhängig vom Entwicklungsstadium eine unregelmäßige Verteilung im Cytoplasma auf (Abb. 6).

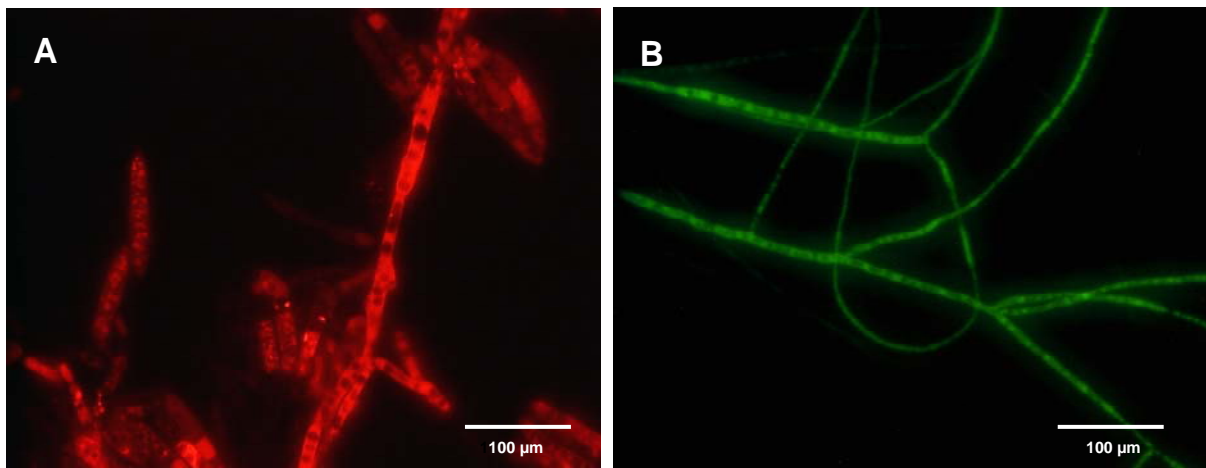


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Myzels von (A) *F. avenaceum* transformiert mit DsRed und (B) *F. culmorum* transformiert mit EGFP

Sowohl bei EGFP- als auch bei DsRed-Transformanten der verschiedenen Arten waren zwei unterschiedliche Verteilungsmuster der fluoreszierenden Proteine im Cytosol zu erkennen. Zum einen lag eine vollkommen gleichmäßige Verteilung vor, andererseits aber waren auch globuläre Strukturen zu beobachten.

3.1.4 Stabilität der Transformanten

Die Transformationen der fünf *Fusarium*-Arten waren von hoher genetischer Stabilität. Auch über einen längeren Zeitraum der Kultivierung hinweg blieb eine fortgesetzte Expression der Transgene erhalten. Da das Hauptaugenmerk im weiteren Verlauf der Arbeit auf den beiden *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* liegen sollte, wurden alle weiteren Experimente mit diesen beiden Arten durchgeführt. Von jeder Transformationsvariante, also *F. avenaceum* mit EGFP und DsRed-Express und des Gleichen mit *F. graminearum*, wurden jeweils drei Klone auf ihre Transformationsstabilität hin getestet. Diese Transformanten wurden auf nichtselektivem Medium kultiviert und behielten dennoch ihre Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin. Des Weiteren wurden sie in regelmäßigen Zeitabständen aus Kryokulturen angezogen und wiesen auch nach monatelanger Lagerung noch immer eine starke Expression der Reporterproteine in Myzel und Konidien auf.

Die phänotypische Analyse der verschiedenen Transformanten mittels Fluoreszenzmikroskopie ergab mithin eine hohe Expression der beiden Reporterproteine EGFP und DsRed-Express in fünf Arten der Gattung *Fusarium*. Die durch die Transformation mit den Genen für fluoreszierende Proteine ermöglichte Sichtbarmachung der Pilze war die Grundvoraussetzung für weitere Untersuchungen möglicher Interaktionen.

3.1.5 Integration der Gene für Reporterproteine

Obwohl die Integration der beiden Gene EGFP und DsRed-Express in das Genom des jeweiligen *Fusarium*-Isolates schon durch die im Fluoreszenzmikroskop sichtbare Expression der Reporterproteine nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich noch der molekularbiologische Nachweis des erfolgreichen Einbaus der Kasette erbracht. Zu diesem Zwecke wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Für den Nachweis des EGFP-Gens wurde das egfp-Fragment aus dem Plasmid pSM1 (ca. 800 bp) als Hybridisierungssonde eingesetzt. Die Integration des Gens DsRed-Express hingegen wurde durch Hybridisierung mit der Sonde, die aus dem Gen DsRed-Express (646 bp) aus dem dazugehörigen Plasmid hergestellt wurde, nachgewiesen.

Nach dem Restriktionsverdau der genomischen DNA der EGFP-Transformanten mit dem Restriktionsenzym *Xba*I sollte ein DNA-Fragment von etwa 1800 bp (gpd-Promotor + egfp) nachgewiesen werden können (Abb. 7).

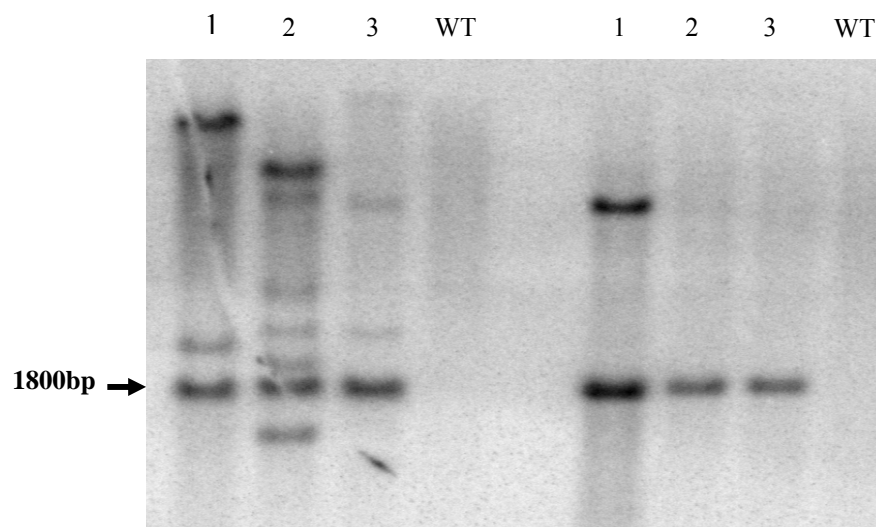


Abb. 7: Southern Blot Analyse genomischer DNA von *F. avenaceum* und *F. graminearum* zum Nachweis der Integration des egfp-Gens. Nachweis: mit ³²Phosphor radioaktiv markierte Sonde egfp. (1-3 = *F. avenaceum*-Transformanten, 4 = Wildtyp Kontrolle *F. avenaceum*, 5-7 = *F. graminearum*-Transformanten, 8 = Wildtyp Kontrolle *F. graminearum*)

In allen sechs Transformanten konnte die Integration des egfp-Gens anhand des erwarteten Hybridisierungsfragments von 1800 bp nachgewiesen werden. Abgesehen davon waren aber bei vier Transformanten noch einige weitere Fragmente zu erkennen.

Auch der erfolgreiche Einbau des zweiten Reportergens dsRed in das Genom der beiden *Fusarium*-Arten konnte mit Hilfe des Southern Blots erwiesen werden (Abb. 8).

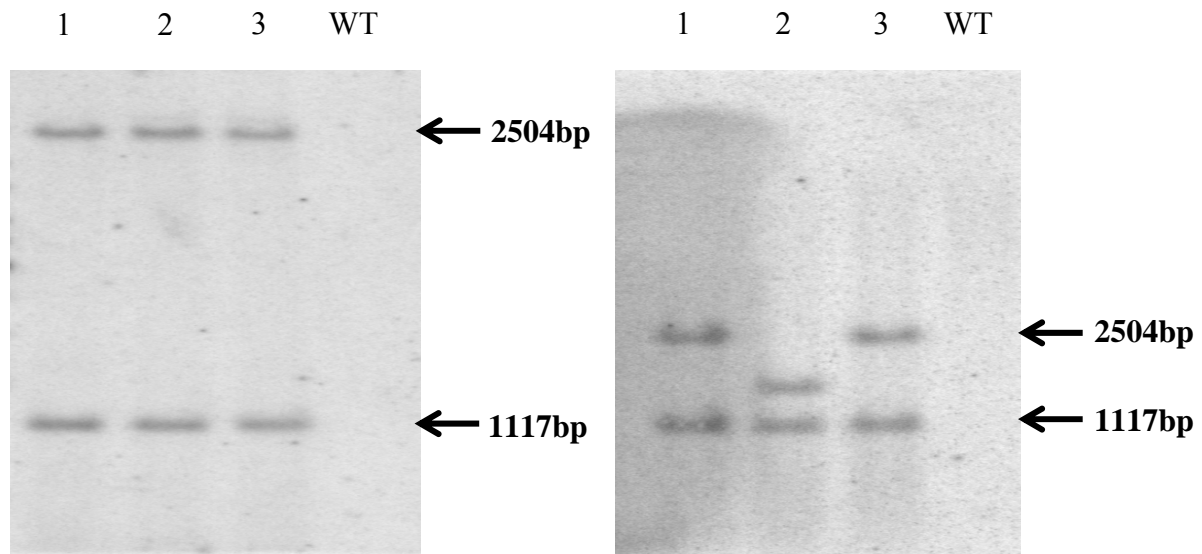


Abb. 8: Southern Blot Analyse genomischer DNA von *F. avenaceum* und *F. graminearum* zum Nachweis der Integration des dsRed-Gens. Nachweis: mit 32 Phosphor radioaktiv markierte Sonde dsRed. (1-3 = *F. avenaceum*-Transformanten, 4 = Wildtyp-Kontrolle *F. avenaceum*, 5-7 = *F. graminearum*-Transformanten, 8 = Wildtyp-Kontrolle *F. graminearum*)

In diesem Fall wurde die genomische *Fusarium*-DNA mit dem Restriktionsenzym *Pst*I hydrolysiert. Da in dem Plasmid pPgpd-DsRed zwei Schnittstellen für dieses Enzym enthalten sind, war in der Southern Blot Analyse mit zwei Fragmenten der Größe 1117 bp und 2504 bp zu rechnen. Mit Ausnahme des zweiten Klons von *F. graminearum* waren in den Blots ausschließlich die erwarteten Banden zu erkennen. Bei ersterem fehlte das Hybridisierungsfragment von 2504 bp. Im Zuge dieser genetischen Analyse der Integration der Genkassetten wurde in allen Fällen der Nachweis des Einbaus erbracht.

3.2 Einfluss der Transformation auf die Fitness der Transformanten von *Fusarium* spp.

Da die Erkenntnisse, die mit Hilfe transformierter *Fusarium*-Arten gewonnen würden, auch auf den jeweiligen Wildtyp übertragbar sein sollten, mussten Transformanten ermittelt werden, die sich Fitness, Vitalität und Pathogenität betreffend, möglichst wenig vom Wildtyp unterschieden. Um eine Aussage darüber machen zu können, ob die Mutationen des Pilzgenoms durch die Transformation eine Veränderung des Phänotyps der Transformanten im Vergleich mit den jeweiligen Wildtypen herbeigeführt hatten, wurden unterschiedliche Merkmale wie Koloniewachstum auf verschiedenen Medien und Sporulation der Klone mit denen des entsprechenden Wildtyps verglichen.

3.2.1 Auswirkungen auf das Myzelwachstum

Da die für die Transformationen verwendeten Vertreter der Gattung *Fusarium* im Labor vor allem auf festen Medien kultiviert werden, stellt das Wachstum auf verschiedenen Agars ein wichtiges Merkmal zur Beurteilung ihrer Vitalität und Fitness dar. Daher wurden auf PDA und SNA (Minimalmedium) Myzelwachstumstests durchgeführt. Das Wachstum der Transformanten und der entsprechenden Wildtypen wurde über einen Zeitraum von drei Tagen hinweg anhand der Messung der Koloniegröße täglich ermittelt.

3.2.1.1 Wachstum auf Vollmedium

Zunächst wurden diese Experimente auf dem Vollmedium PDA durchgeführt. Sowohl von *F. avenaceum* als auch von *F. graminearum* wurden Animpfstücke von 5 mm Durchmesser aus Kulturen von den Wildtypen und drei EGFP- und drei DsRed-Transformanten auf PDA-Platten gesetzt.

Am ersten Tag der Untersuchung von dem Wildtyp von *F. avenaceum* und seinen Transformanten waren keine signifikanten Unterschiede im Wachstum zu erkennen (Abb. 9).

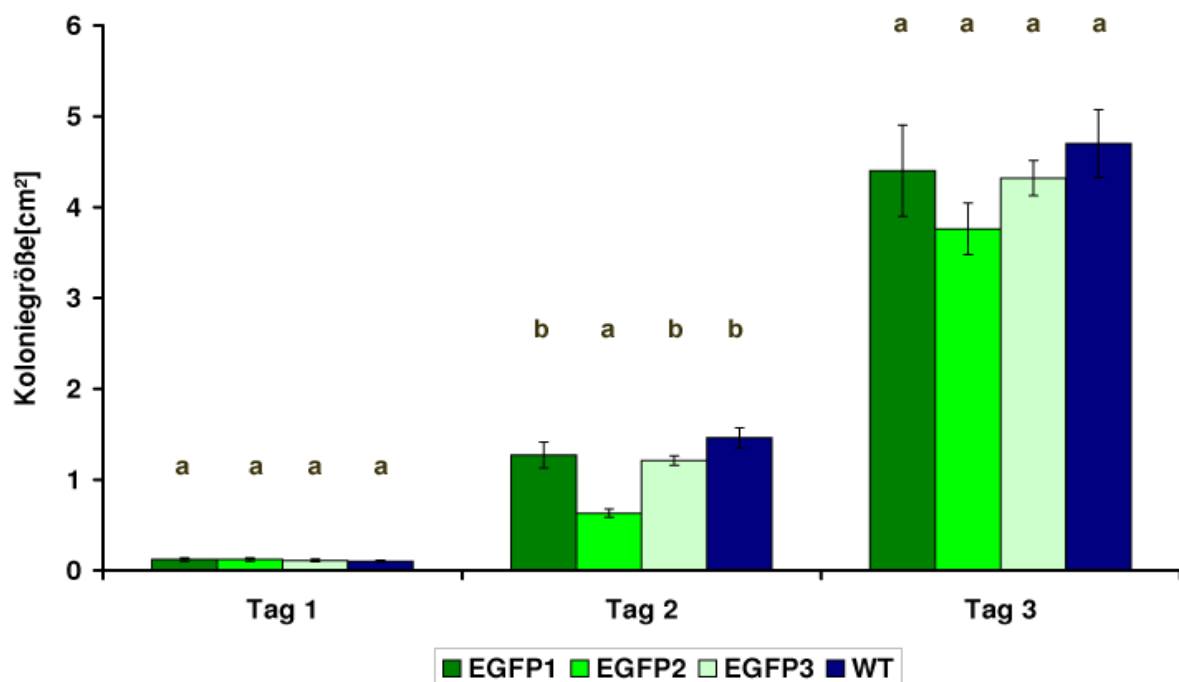


Abb. 9: Myzelwachstum auf PDA von *F. avenaceum* Wildtyp (WT) und drei EGFP Transformanten (EGFP1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Am zweiten Tagen bildeten die Transformanten FAVEGFP1, FAVEGFP3 und der Wildtyp signifikant größere Kolonien als FAVEGFP2. Diese Beobachtung konnte am dritten Tag der Messungen nicht mehr gemacht werden. Alle Klone und der Wildtyp wiesen keine signifikanten Unterschiede in den Koloniegrößen auf. Die Verteilung der Koloniegrößen zeigte das gleiche Muster wie auch schon an Tag 2. Im Vergleich zum Wildtyp wuchsen FAVEGFP1 und FAVEGFP3 ein wenig langsamer, wohingegen FAVEGFP2 ein geringeres Wachstum aufwies. Insgesamt wurde das Wachstum von FAVEGFP2 durch die gentechnische Veränderung am meisten beeinflusst.

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Wachstumstests mit den drei DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 10) zeigten sich an allen drei Versuchstagen signifikante Unterschiede in den Koloniegrößen.

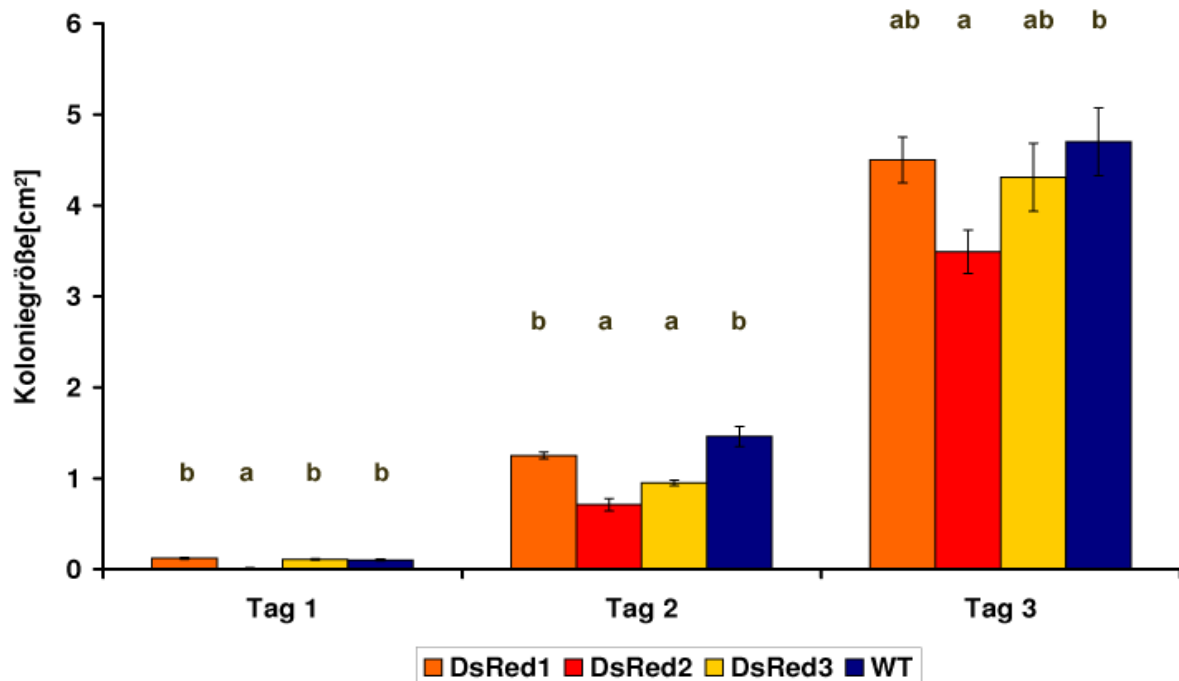


Abb. 10: Myzelwachstumstest auf PDA von *F. avenaceum* Wildtyp (WT) und drei DsRed Transformanten (DsRed1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Wiederum wies Klon DsRed2 das geringste Wachstum auf, was sich auch an den folgenden zwei Tagen nicht änderte. Im Laufe der beiden letzten Tage vergrößerte sich die Diskrepanz im Wachstum zwischen diesem und den drei anderen zu untersuchenden Objekten noch. Generell gedieh der Wildtyp von *F. avenaceum* auf PDA während aller drei Tage am besten, allerdings dicht gefolgt von FAVDsRed1.

Eine etwas andere Situation zeigte sich bei der Untersuchung des Wildtyps von *F. graminearum* und seinen EGFP-Transformanten (Abb. 11).

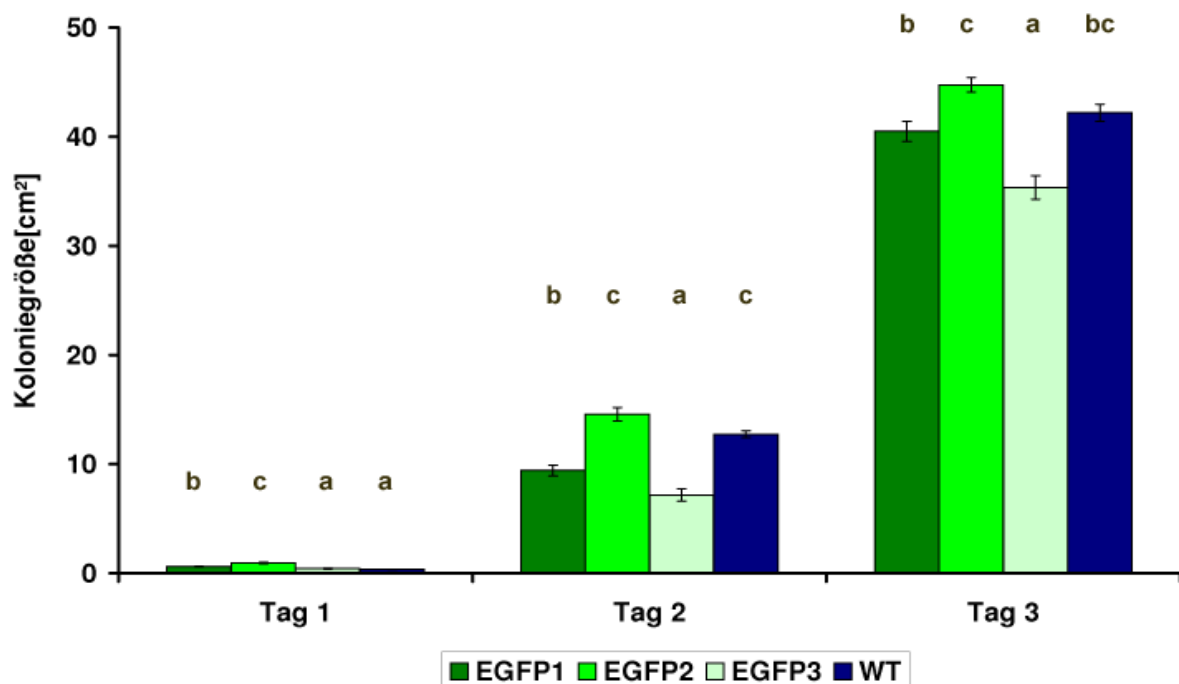


Abb. 11: Myzelwachstumstest auf PDA von *F. graminearum* Wildtyp (WT) und drei EGFP Transformanten (EGFP1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Hier stellte sich FGREGFP2 im Verlaufe der drei Versuchstage als dem Wildtyp im Wachstum leicht überlegen heraus. Dies war schon von Versuchsbeginn an zu beobachten, als bei FGREGFP2 eine signifikant höhere Koloniegröße als beim Wildtyp ermittelt wurde. Während FGREGFP3 am zweiten Tag die niedrigste Koloniegröße aufwies, lag FGREGFP2 signifikant höher. Die gleiche Situation war auch am dritten Tag zu beobachten. Die Werte für die Größen der Kolonien von FGREGFP1 und FGRWT wurden flankiert von dem signifikant höchsten Wert bei FGREGFP2 und dem signifikant niedrigsten bei FGREGFP3.

Bei der Ermittlung der Koloniegrößen des Wildtyps von *F. graminearum* und den DsRed-Transformanten traten abermals an allen drei Versuchstagen signifikante Unterschiede auf (Abb. 12).

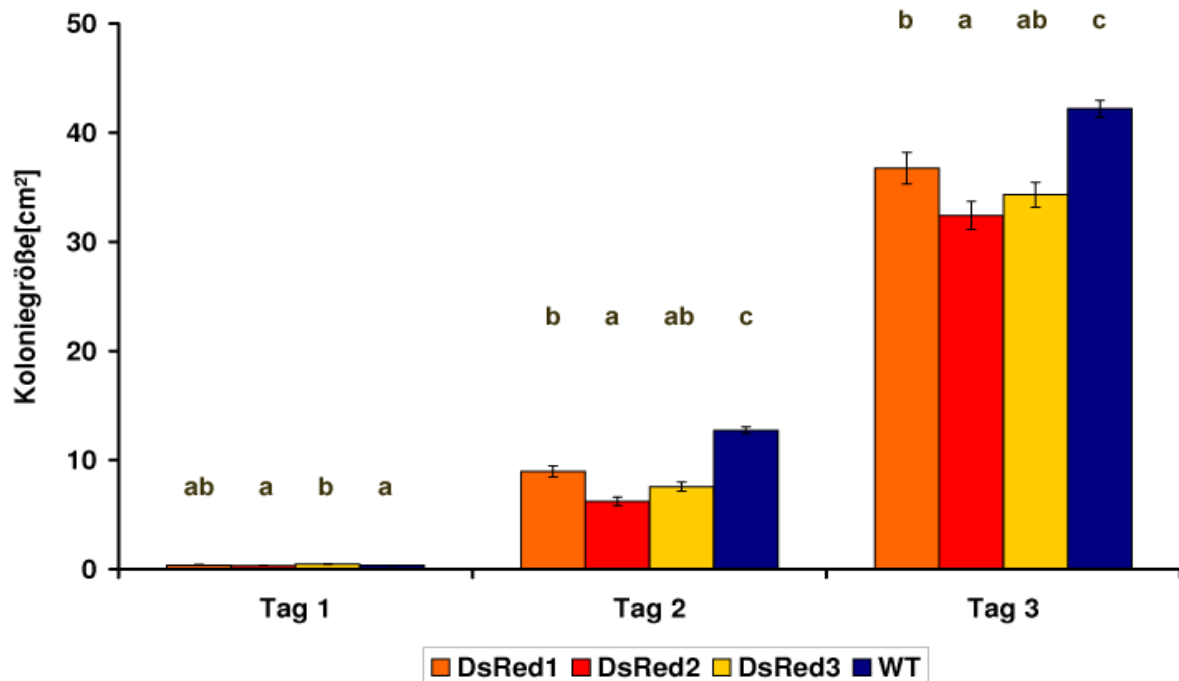


Abb. 12: Myzelwachstumstest auf PDA von *F. graminearum* Wildtyp (WT) und drei DsRed-Transformanten (DsRed1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Der Wildtyp zeigte sowohl an Tag 2 als auch an Tag 3 ein signifikant höheres Wachstum auf PDA. Bei Betrachtung der Transformanten erwies sich FGRDsRed1 als den beiden anderen Klonen leicht überlegen. FGRDsRed2 wurde durch die Integration der Genkassette in seinem Wachstum am stärksten beeinträchtigt.

3.2.1.2 Wachstum auf Minimalmedium

In einer zweiten Versuchsreihe wurde, wie oben schon kurz erwähnt, das Wachstum der beiden *Fusarium*-Arten und ihrer Transformanten auf dem Minimalmedium SNA untersucht, wobei der Versuchsablauf der gleiche war wie bei der Ermittlung der Koloniegrößen auf PDA.

Bei der Messung an Tag 1 waren keine signifikanten Unterschiede im Wachstum des Wildtyps von *F. avenaceum* und seinen EGFP-Transformanten zu erkennen (Abb. 13).

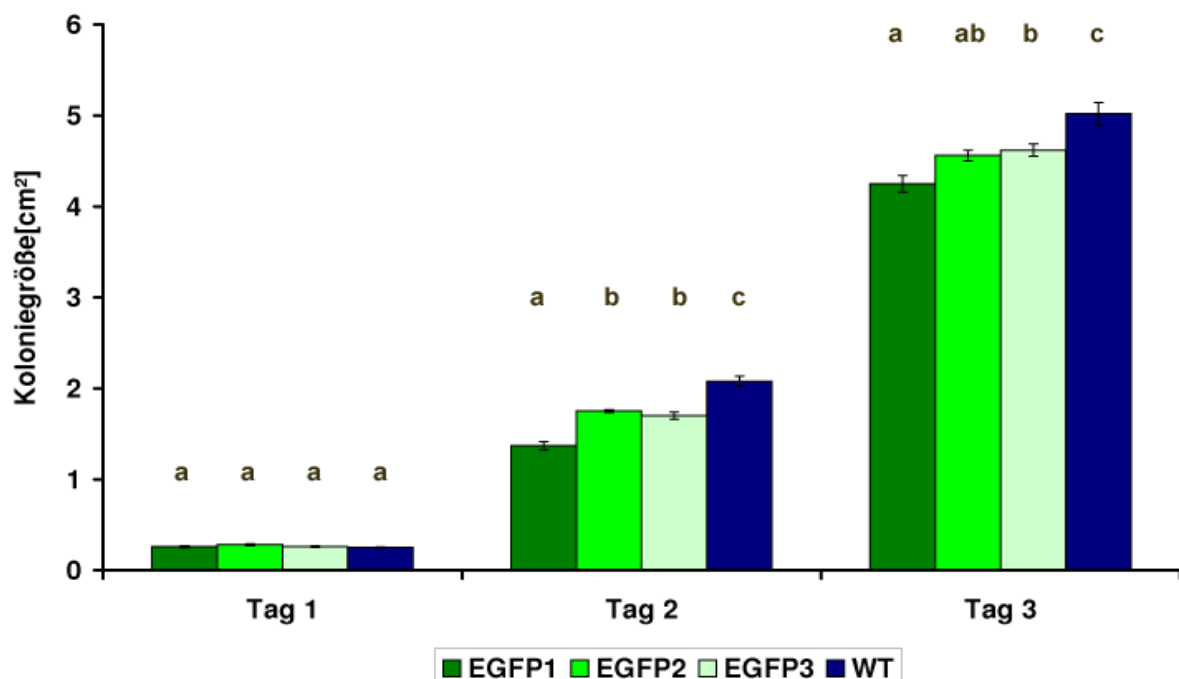


Abb. 13: Myzelwachstumstest auf SNA von *F. avenaceum* Wildtyp (WT) und drei EGFP Transformanten (EGFP1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Am zweiten Tag hingegen zeigte der Wildtyp die signifikant höchste, wohingegen FAVEGFP2 und FAVEGFP3 unter und FAVEGFP1 sogar deutlich unter diesem Wert lagen. An Tag 3 traten keine Veränderungen dieses Verteilungsmusters auf, gleichbleibend waren die Unterschiede signifikant. Die geringste Koloniegröße war bei FAVEGFP1 zu verzeichnen, gefolgt von FAVEGFP2 und FAVEGFP3. Der Wildtyp wies wie auch schon am Vortag beobachtet die größten Kolonien auf.

Die Größen der Kolonien des Wildtyps von *F. avenaceum* und seinen DsRed-Klonen unterschieden sich hingegen schon am ersten Tag signifikant (Abb. 14), wobei sich hier schon abzeichnete, dass FAVDsRed2 das signifikant niedrigste Wachstum aufwies.

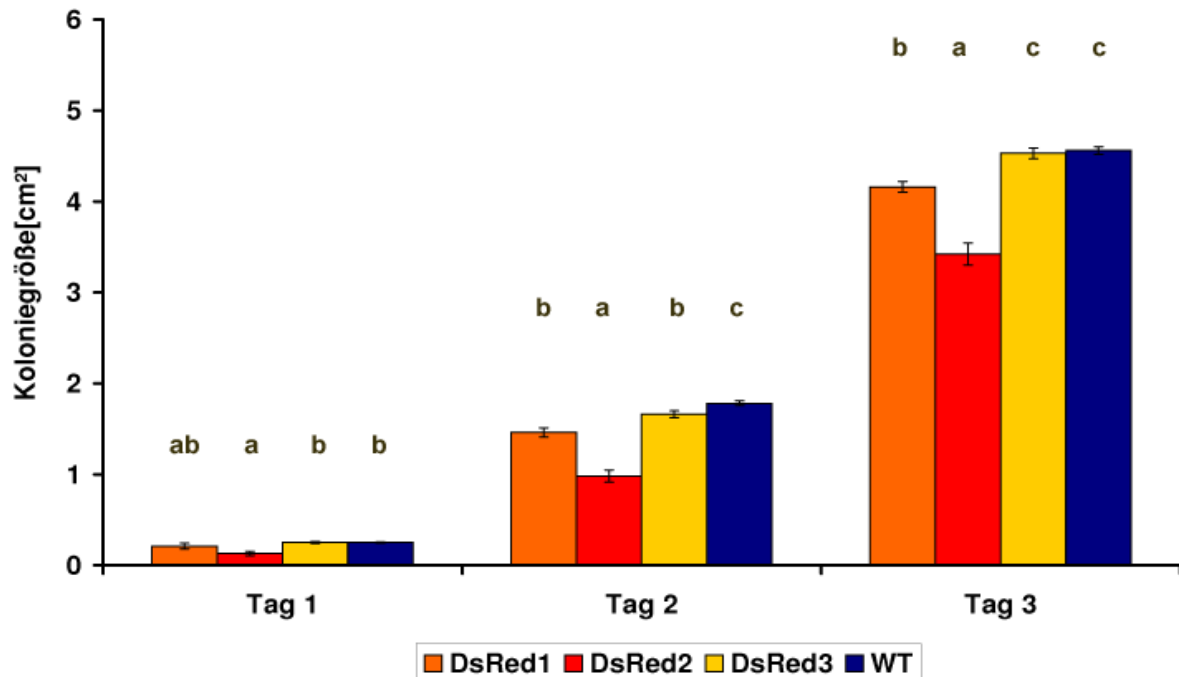


Abb. 14: Myzelwachstumstest auf SNA von *F. avenaceum* Wildtyp (WT) und drei DsRed Transformanten (DsRed1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Diese Beobachtung bestätigte sich im Laufe der folgenden zwei Tage. An Tag 2 wiesen der Wildtyp und FAVDsRed3 sehr geringe Unterschiede auf, gefolgt von FAVDsRed1. Am dritten Versuchstag waren die Pilzkolonien von FAVDsRed3 und dem Wildtyp fast gleich groß, die Koloniegröße von FAVDsRed1 war hingegen signifikant niedriger.

Ebenso wie auf PDA bildet *F. graminearum* auch auf SNA wesentlich größere Kolonien aus als *F. avenaceum* (Abb. 15).

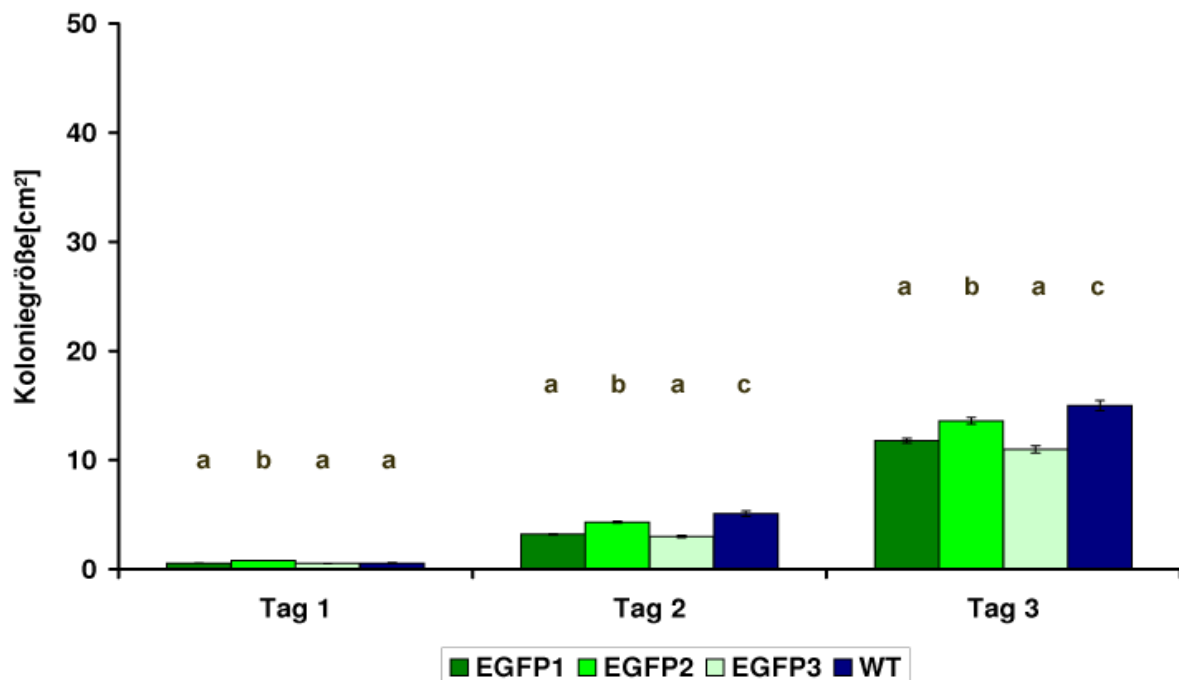


Abb. 15: Myzelwachstumstest auf SNA von *F. graminearum* Wildtyp (WT) und drei EGFP Transformanten (EGFP1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Am ersten Tag der Untersuchung unterschied sich nur FGREGFP2 signifikant von den anderen beiden Klonen und dem Wildtyp. Am zweiten Tag hingegen zeigte der Wildtyp den signifikant höchsten Wert für die Koloniegrößen, dicht gefolgt von FGREGFP2. FGREGFP1 und FGREGFP3 lagen hingegen signifikant niedriger. Auch hier war am dritten Tag das gleiche Verteilungsmuster der Koloniegrößen zu finden wie am Tag zuvor. Für den Wildtyp wurde erneut der signifikant höchste Wert ermittelt und für FGREGFP3 wiederum der niedrigste. Dazwischen lagen FGREGFP1 und FGREGFP2.

Im Laufe der Myzelwachstumstests mit dem *F. graminearum*-Wildtyp und seinen DsRed-Transformanten ergab sich ein gleichmäßigeres Bild (Abb. 16).

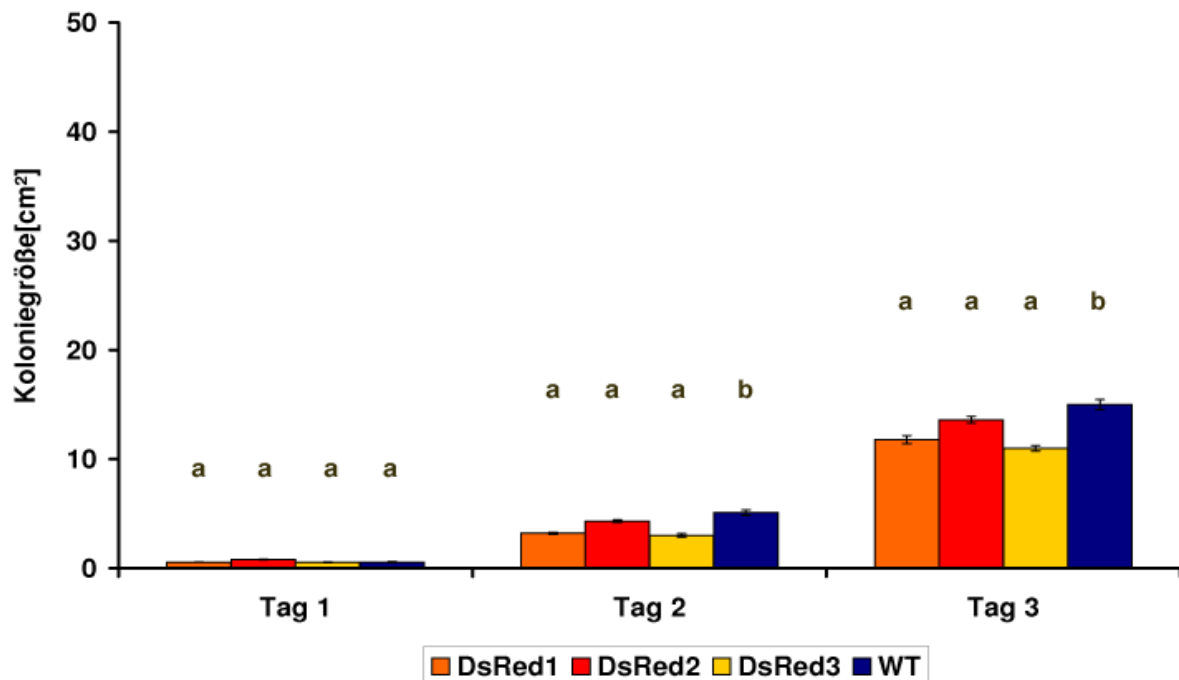


Abb. 16: Myzelwachstumstest auf SNA von *F. graminearum* Wildtyp (WT) und drei DsRed Transformanten (DsRed1-3) (Tukey-Test, $p \leq 0,05$, $n = 12$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp an)

Am ersten Tag traten keine signifikanten Unterschiede in den Koloniegrößen auf. Am zweiten Tag war ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und seinen drei Transformanten zu erkennen. Wie schon häufiger beobachtet, hielt dieses Verteilungsmuster auch bis zum nächsten Tag an. Der signifikant höchste Wert lag wiederum beim Wildtypen, gefolgt von FGRDsRed1, FGRDsRed2 und FGRDsRed3.

Insgesamt betrachtet wurden im Zuge der Wachstumstests auf PDA und SNA Transformanten gefunden, die in ihrem Wachstum nur sehr geringe Unterschiede zu den jeweiligen Wildtypen aufwiesen und daher für weiterführende Untersuchungen in Frage kamen.

3.2.2 Auswirkungen auf die Sporulation

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt bei der Beurteilung der Fitness und Vitalität von *Fusarium*-Arten ist die Fähigkeit und das Ausmaß der Sporulation. Um hierüber und über die Ähnlichkeit zum jeweiligen Wildtyp Aussagen machen zu können, wurden Sporulationstests auf exakt 20 ml SNA-Platten durchgeführt, die mit einem Agarstück von 5 mm Durchmesser beimpft wurden. Nach sieben Tagen wurden die Konidien mit sterilem Aqua dest. abgeerntet und ihre Anzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt (Tab. 5).

Tab. 5: Sporulation der Wildtypen und EGFP- und DsRed-Transformanten von *F.avenaceum* (+ ~ 1,6 x 10⁴ Konidien/ml, ++ ~ 5,5 x 10⁴ Konidien/ml, +++ ~ 1,4 x 10⁵ Konidien / ml) und *F. graminearum* (+ ~ 3,3 x 10³ Konidien/ml, ++ ~ 1,6 x 10⁴ Konidien/ml, +++ ~ 2,1 x 10⁴ Konidien/ml) auf SNA

Art	EGFP-Transformanten				DsRed-Transformanten			
	EGFP1	EGFP2	EGFP3	WT	DsRed1	DsRed2	DsRed3	WT
<i>F. avenaceum</i>	++	+	+	+	+	++	++	+
<i>F. graminearum</i>	+++	+	++	+	++	++	+++	+

Bei *F. avenaceum* war bei dem Transformanten FAVEGFP1 eine stärker ausgeprägte Fähigkeit zur Sporulation zu beobachten als bei dem Wildtyp und den anderen beiden Transformanten. Bei den DsRed-Klonen sporulierten die Klone FAVDsRed2 und FAVDsRed 3 besser als der dritte Transformant und als der Wildtyp. Im Falle von *F. graminearum* und seinen EGFP-Transformanten zeigte FGREGFP1 eine wesentliche höhere Sporulation als der Wildtyp. Die Transformanten FGREGFP2 und FGREGFP3 sporulierten gering und mäßig stark. Auch bei den DsRed-Klonen wies einer, FGRDsRed3, eine stark ausgeprägte Sporulation auf, wohingegen die beiden anderen Klone eine mäßige Sporulation zeigten. Der Wildtyp sporulierte in diesem Fall am schlechtesten. Bei einem weiteren DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* (nicht dargestellt), der in den Wachstumstests ein wildtypähnliches Wachstumsverhalten gezeigt hatte, wurden keine Konidien gebildet.

Bei den in der Tabelle aufgeführten Transformanten wurde größtenteils ein mit dem Wildtyp vergleichbares Maß an Sporulation beobachtet und nur einer der Klone bei beiden *Fusarium*-Arten zeigte eine deutliche höhere Produktion von Konidien.

3.3 Pathogenität an Wirtspflanzen

3.3.1 Befallsentwicklung an Weizenblättern

Um herauszufinden, ob die Integration der Reportergene EGFP und DsRed-Express in das Genom von *F. avenaceum* und *F. graminearum* Einfluss auf die Pathogenität dieser beiden Ascomyceten-Arten verglichen mit den entsprechenden Wildtypen hatte, wurden Blätter von Weizenpflanzen mit den Wildtypen und den beiden oben erwähnten Transformanten mittels Punktinokulation infiziert (Abb. 17).

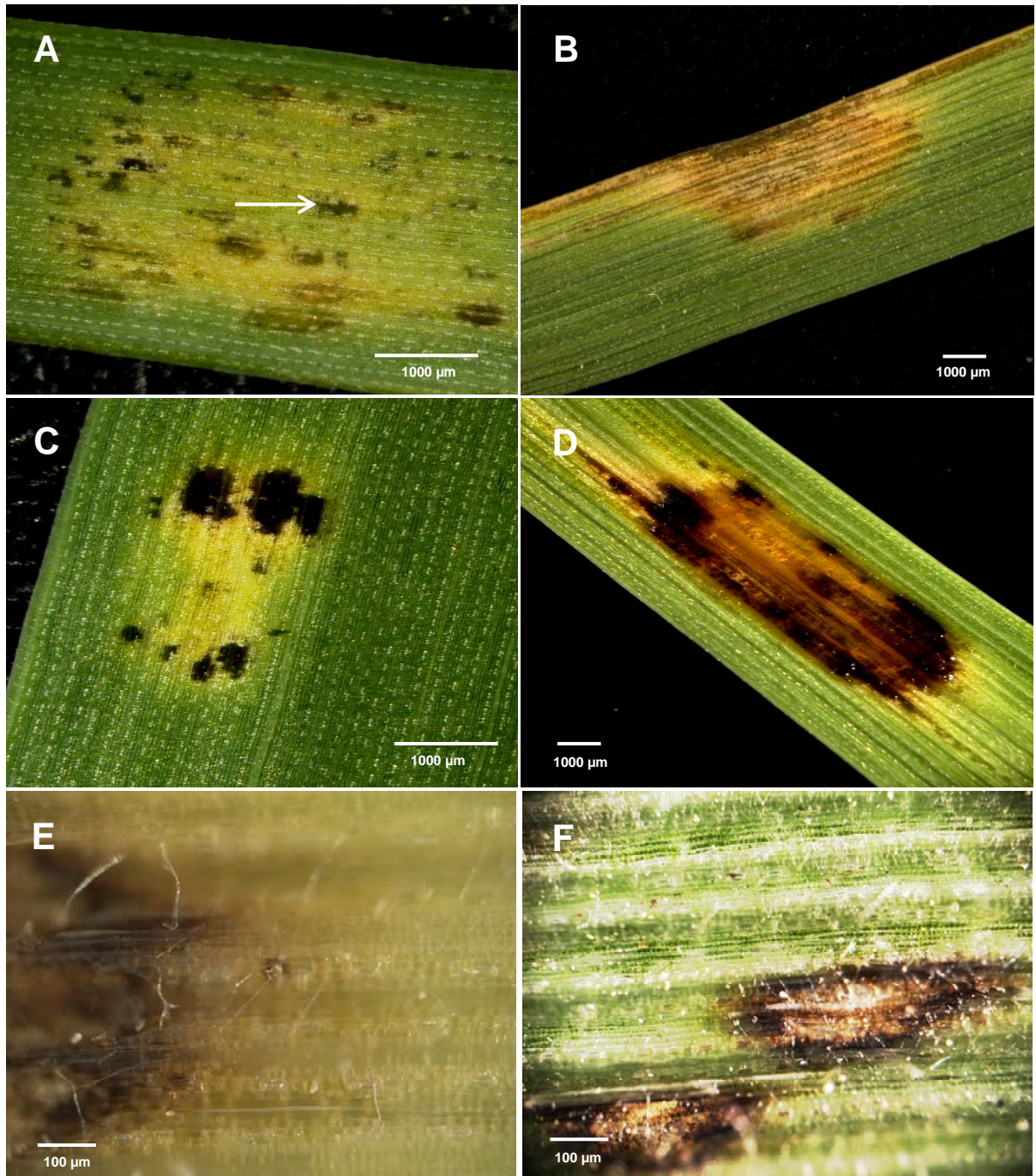


Abb. 17: Stereomikroskopische Aufnahmen des Verlaufs der Infektion eines Weizenblattes durch einen DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (A) chlorotisches Blattgewebe mit beginnender noch lokal begrenzter Nekrotisierung (Pfeil), (B) sich am Blattrand zunehmend ausbreitende Nekrose, (C) dunkelbraune Verfärbung durch starke Nekrotisierung des Blattgewebe, (D) großflächige, braune, nekrotische Läsion (E) braune Läsion im Blattgewebe und *Fusarium*-Myzel auf der Blattoberfläche, (F) große nekrotische Läsionen mit darüber liegendem Pilzmyzel

Etwa zwei Tage nach der Infektion von Weizenblättern mit *F. graminearum* begannen um die Inokulationsstellen herum die ersten Chlorosen sichtbar zu werden. Das vormals grüne Blattgewebe nahm eine zunehmend gelbliche Färbung an. Im weiteren Verlauf waren etwa vier Tage nach Inokulation erste bräunliche Flecken zu erkennen. An diesen Stellen begann das Blattgewebe aufgrund der Zerstörung durch den Pilzbefall nekrotisch zu werden (Abb. 16A). Diese Nekrotisierung schritt voran, wobei dieser Vorgang nicht das gesamte Blatt umfasste, sondern wiederum auf die Umgebung der Inokulationsstelle beschränkt blieb. Da durch das Vorhandensein des Pilzes das Pflanzengewebe zerstört wurde und somit keine ausreichende Versorgung mit Wasser und Nährstoffen mehr möglich war, starb das Blatt im Laufe der Zeit ab.

Der Hergang der Infektion verlief bei dem Wildtypen und dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* sehr ähnlich (Abb. 18). Anhand eines Index wurde die Symptomausprägung dreizehn Tage lang bonitiert.

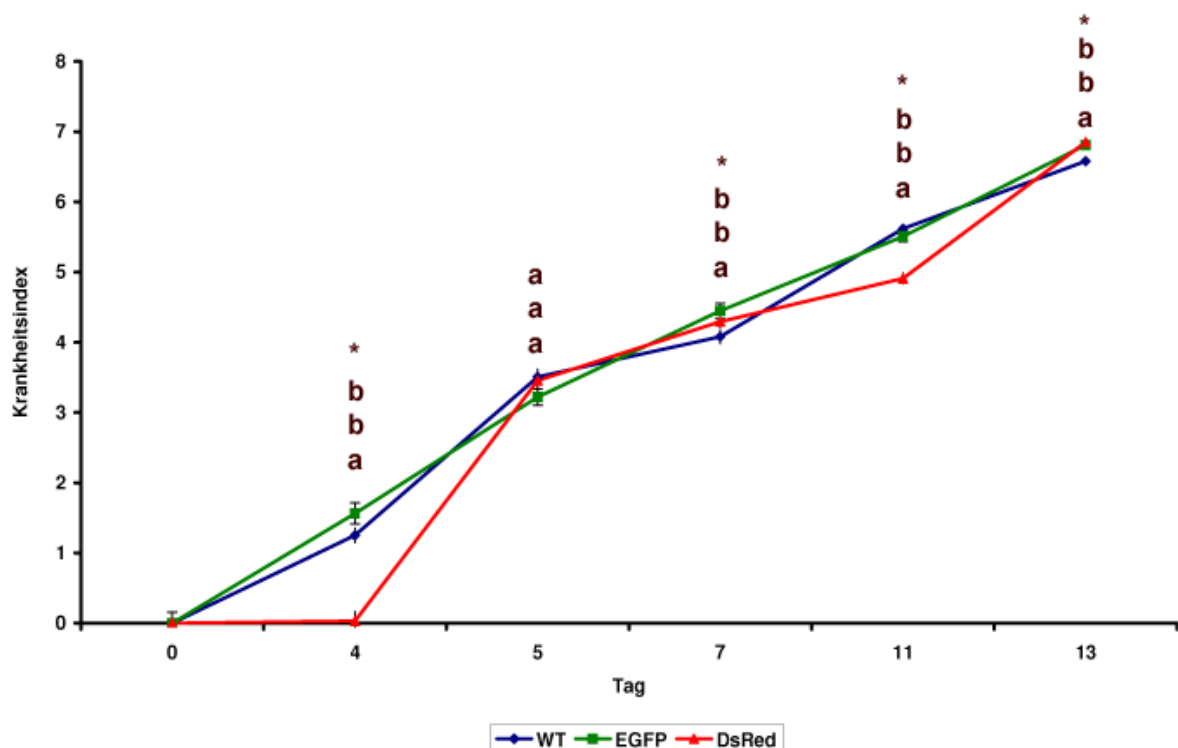


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Symptomentwicklung an Weizenblättern durch den Wildtypen und einen EGFP- und DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* dargestellt in Tagen nach der Inokulation, 0 = kein Symptom, 1 = leichte Chlorosenbildung, 2 = mittelstarke Chlorosenbildung, 3 = starke Chlorosenbildung, 4 = beginnende Nekrotisierung, 5 = fortgeschrittene Nekrotisierung, 6 = vollständige Nekrotisierung, 7 = Absterben des Blattes (Paarvergleich mit Mann-Whitney-U-Test, n = 99, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Im Laufe der ersten vier Tage trat eine mittelstarke Bildung von Chlorosen ein, die sich bis zum fünften Tag nach Inokulation fortsetzte. Zu diesem Zeitpunkt begann die Nekrotisierung des Blattgewebes. Der Infektionsverlauf durch den DsRed-Transformanten verzögerte sich um mehrere Tage. Erst am vierten Tag setzte die Bildung von Chlorosen ein. Im Folgenden schritt die Infektion jedoch schneller voran als bei Wildtyp und EGFP-Klon, so dass am fünften Tag ebenfalls die ersten Symptome der Nekrotisierung zu erkennen waren. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich bei allen drei Versuchsobjekten der gleiche Krankheitsverlauf. Die Blätter wurden in zunehmendem Maße nekrotisch und das Gewebe kollabierte vollständig. Dies führte im Laufe der letzten zwei Boniturtage zu einem Absterben der Blätter.

Zu Beginn des Versuchs verlief die Infektion bei Wildtyp und EGFP-Transformant von *F. graminearum* gleich und heftiger als bei Befall durch *F. avenaceum* (Abb. 19).

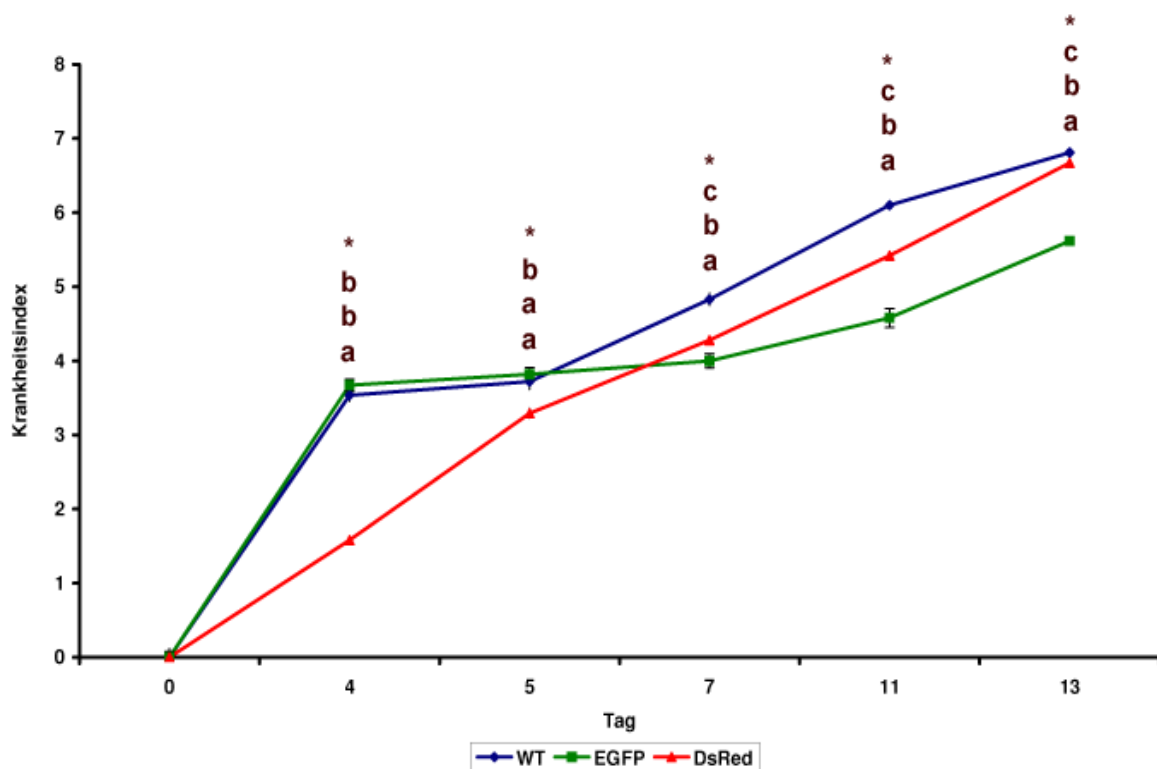


Abb. 19: Verlauf der Symptomentwicklung an Weizenblättern durch den Wildtypen und einen EGFP- und DsRed-Transformanten von *F. graminearum* dargestellt in Tagen nach der Inokulation, 0 = kein Symptom, 1 = leichte Chlorosenbildung, 2 = mittelstarke Chlorosenbildung, 3 = starke Chlorosenbildung, 4 = beginnende Nekrotisierung, 5 = fortgeschrittene Nekrotisierung, 6 = vollständige Nekrotisierung, 7 = Absterben des Blattes (Paarvergleich mit Mann-Whitney-U-Test, n = 99, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Schon am vierten Tag setzte hier die Nekrotisierung ein. An diesem Stadium änderte sich im Falle des EGFP-Transformanten in den folgenden fünf Tagen nichts, während bei der Infektion durch den Wildtypen ab dem fünften Tag die Krankheit stetig voranschritt. Am Ende der Erfassung des Krankheitsverlaufs hervorgerufen durch den EGFP-Transformanten war die Nekrotisierung zwar stark fortgeschritten, aber die Blätter waren noch nicht abgestorben. Die Infektion durch FGRDsRed hingegen verlief zu Beginn milder und erreichte das Stadium der beginnenden Nekrotisierung erst am siebten Tag nach Inokulation. In den folgenden sechs Tagen nahm dieser Zerstörungsvorgang des Blattgewebes stetig zu und gipfelte auch hier, ebenso wie im Falle des Wildtyps, im Absterben der Weizenblätter.

Alle vier untersuchten Transformanten zeigten ein dem jeweiligen Wildtyp sehr ähnliche Symptomausprägung und erfüllten somit eine weitere Bedingung, um für weitere Untersuchungen eingesetzt zu werden. Aufgrund der Ergebnisse des Southern Blots, der Myzelwachstumstests und der zuletzt beschriebenen Beobachtungen wurden für diese und alle weiteren Untersuchungen einer der EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und einer der DsRed-Transformanten von *F. graminearum* ausgewählt. In der Southern Blot-Analyse ergaben sich für diese beiden Transformanten die Verteilungsmuster mit den wenigsten unerwünschten Banden. In den Fitnessstudien hatten sich diese beiden Transformanten als die vitalsten erwiesen.

3.3.2 Infektion von Weizenährchen

Aufgrund der Expression der Reporterproteine EGFP und DsRed-Express konnten die beiden *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* auf und im Gewebe der Weizenährchen lokalisiert und voneinander unterschieden werden (Abb. 20).

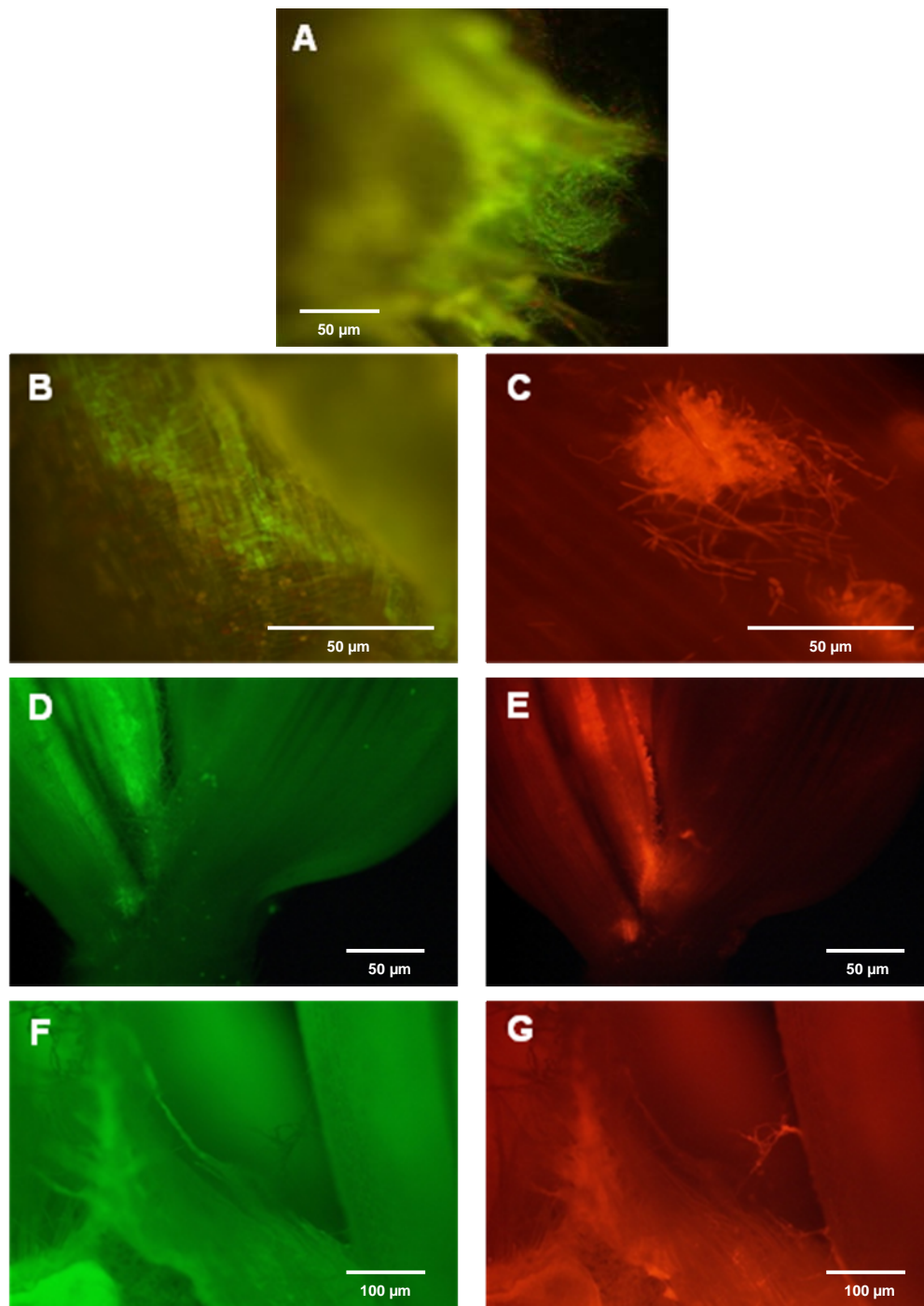


Abb. 20: Infektion eines Weizenährchens mit *Fusarium* spp. (A) Makrokonidien des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* an der oberen Spitze eines Weizenkorns, (B) Myzel des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* auf der Innenseite der Hüllspelze, (C) Myzel des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* auf der Innenseite der Hüllspelze, (D) Myzel des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* auf der Außenseite der Deckspelze, (E) Myzel des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* auf der Außenseite der Deckspelze, (F) Myzel des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* am Korn, (G) Myzel des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* am Korn

Die auskeimenden Makrokonidien der beiden *Fusarium*-Arten bildeten zunächst ein bis zwei Tage nach der Inokulation ein Netzwerk aus Hyphen auf den Innenflächen der Hüllspelzen oder auf den Außenseiten der Deckspelzen. Im Folgenden breitet sich das Myzel dann aus und begann in den Raum zwischen Spelzen und Korn vorzudringen. Die Expression der fluoreszierenden Reportergene vereinfachte die Identifizierung der jeweiligen *Fusarium*-Art, da grünfluoreszierende Hyphen eindeutig *F. avenaceum* zugeordnet werden konnten, während rotfluoreszierende Hyphen immer von *F. graminearum* stammten (Abb. 19F und G). In stereomikroskopischen Aufnahmen konnte an Handschnitten ausgemacht werden, welche der beiden *Fusarium*-Arten die Symptome hervorgerufen hatte (Abb. 21).

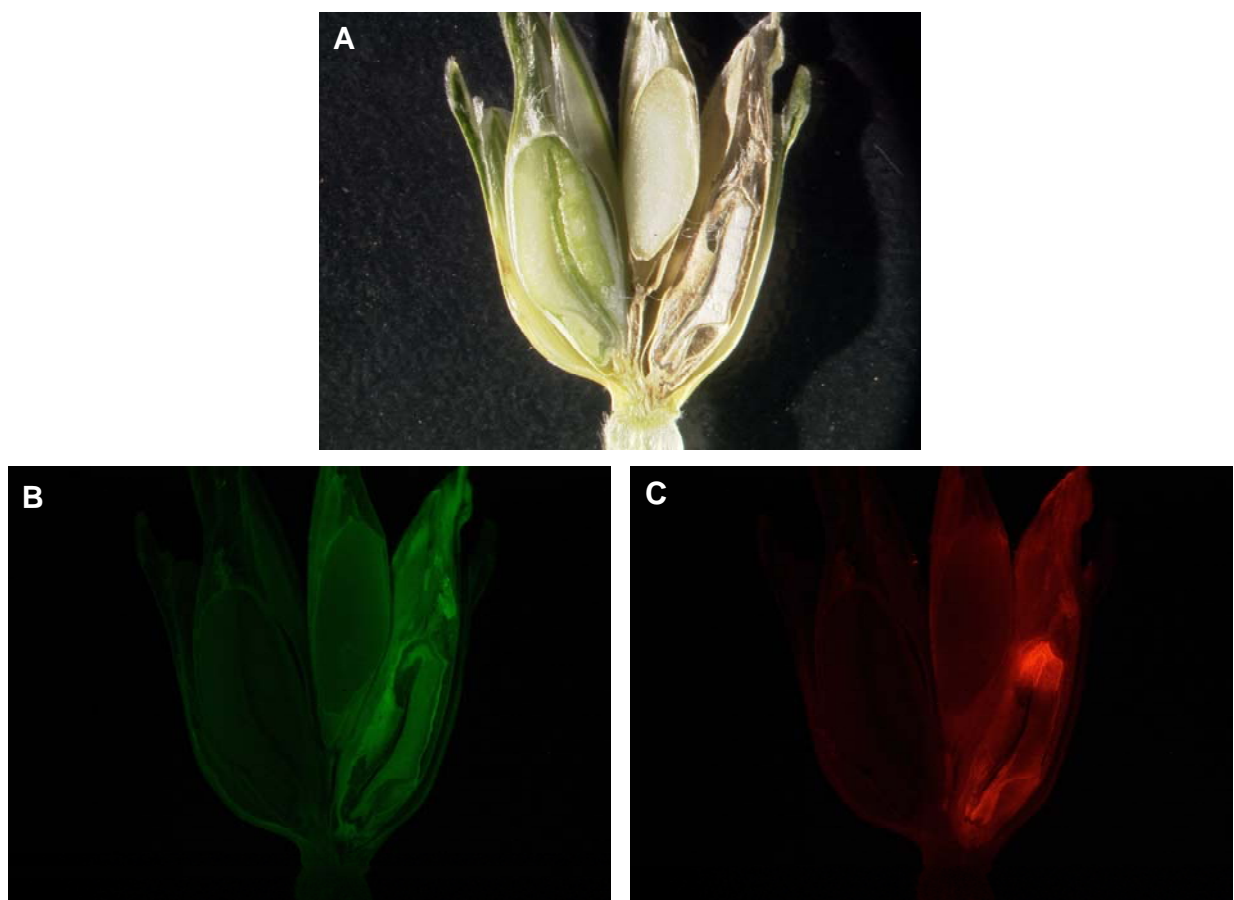


Abb. 21: Koinokulation eines Weizenährchens mit *F. avenaceum* und *F. graminearum* (A) stereomikroskopische Aufnahme des hochinfizierten Korns, (B) Aufnahme mit dem Filter I3 für EGFP (Ursache der grüne Fluoreszenz – Autofluoreszenz des Chlorophylls), (C) Aufnahme mit dem Filter N2.1 für DsRed

In Abbildung 21A wurde auf der rechten Seite des Ährchens mit einer Mischung aus Makrokonidien von *F. avenaceum* und *F. graminearum* inokuliert. Das Korn und die umgebenden Spelzen zeigten die typischen Symptome eines Befalls mit *Fusarium* spp. wie die bräunlichen Verfärbungen und die Nekrotisierung des Gewebes. Auf der anderen Seite wurde ein gesundes Korn ausgebildet. Dort war weder mit dem Filter I3 für das EGFP noch

mit dem Filter N2.1 für das DsRed betrachtet Fluoreszenz zu beobachten. Wie in Abbildung 21B und C zu erkennen, war auf der infizierten Seite des Ährchens eine schwache grüne und eine an einigen Stellen stark ausgeprägte rote Fluoreszenz zu verzeichnen. Erstere wurde durch die Autofluoreszenz des Weizengewebes hervorgerufen und war an stark nekrotisierten Stellen etwas intensiver als an Stellen mit weitgehend intaktem Gewebe. Die Expression von DsRed war an der Basis und an der Spitze des Kornes stärker als in dessen Mitte. In Querschnitten infizierter Weizenkörner wurde ein dichtes Netzwerk aus Hyphen im Mehlkörper und unter der Testa beobachtet (Abb. 22).

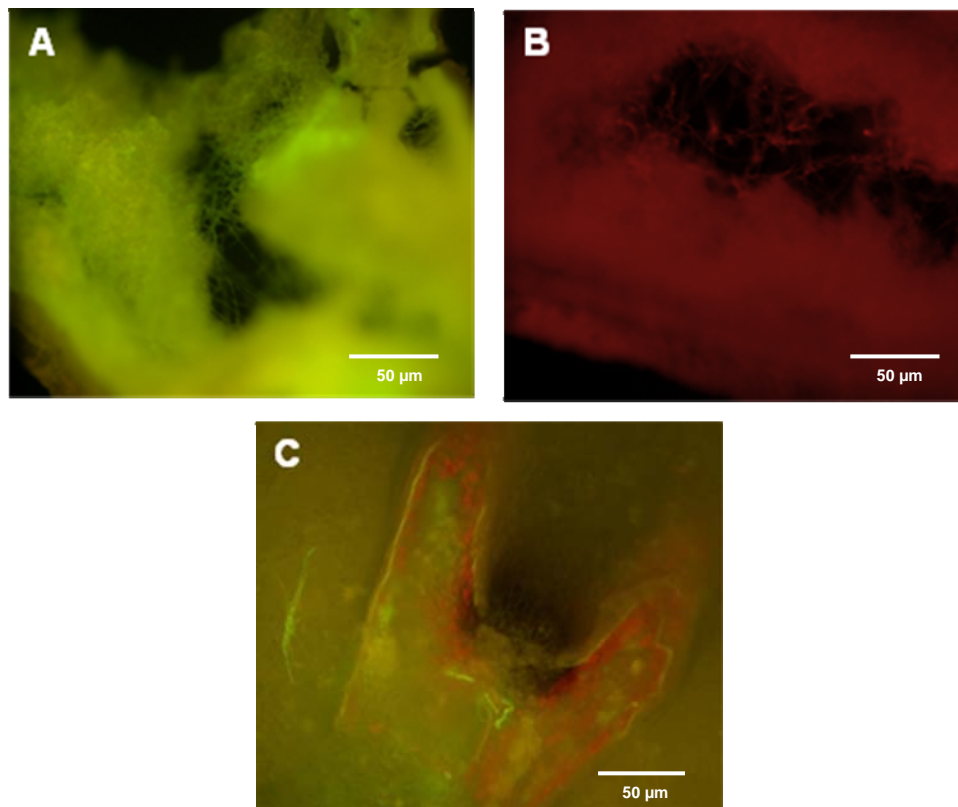


Abb. 22: Infektion eines Weizenkorns (A) Querschnitt durch ein dicht mit Myzel des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* kolonisiertes Weizenkorn, (B) Querschnitt durch ein dicht mit Myzel des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* kolonisiertes Weizenkorn, (C) Querschnitt durch ein dicht mit Myzel des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* kolonisiertes Weizenkorn

Die Mehlkörper der mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* befallenen Körner waren von Myzel durchsetzt und beide Pilze waren im Weizengewebe gut voneinander zu unterscheiden. Im Gewebe der Weizenspelzen wurde ein interzelluläres Wachstum der beiden *Fusarium*-Arten dokumentiert (Abb. 23).

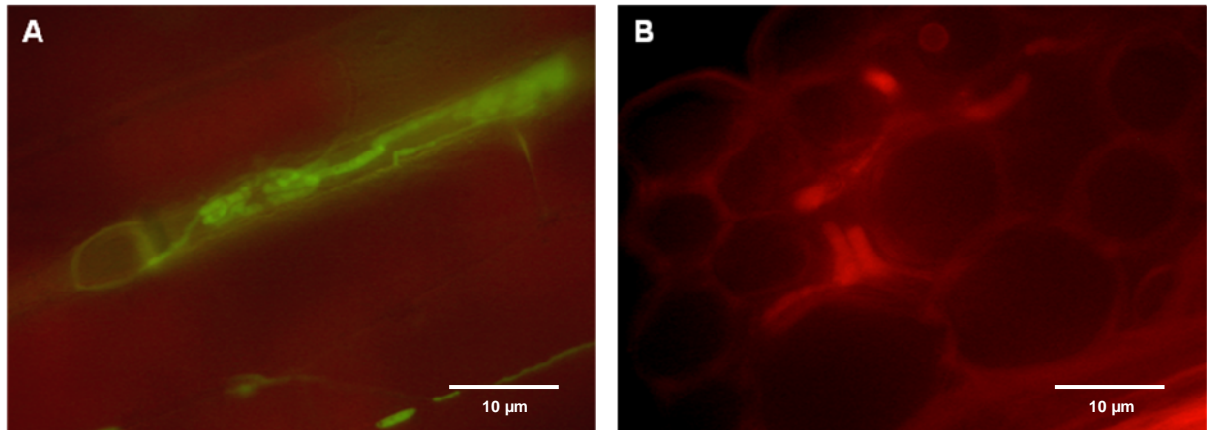


Abb. 23: Infektion von Weizenstrukturen (A) interzelluläres Wachstum des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, (B) interzelluläres Wachstum des DsRed-Transformanten von *F. graminearum*

3.4 Interaktionen zwischen *Fusarium* spp. *in vitro*

Die Transformation der beiden *Fusarium*-Arten mit zwei verschiedenen Reporterproteinen eröffnete die Möglichkeit, Interaktionsstudien *in vitro* und *in situ* durchzuführen. Die beiden *Fusarium*-Arten, *F. avenaceum* und *F. graminearum*, bilden bei Anzucht auf festen Medien kreisrunde Kolonien aus, wobei *F. graminearum* eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit aufweist als *F. avenaceum* (Abb. 24).

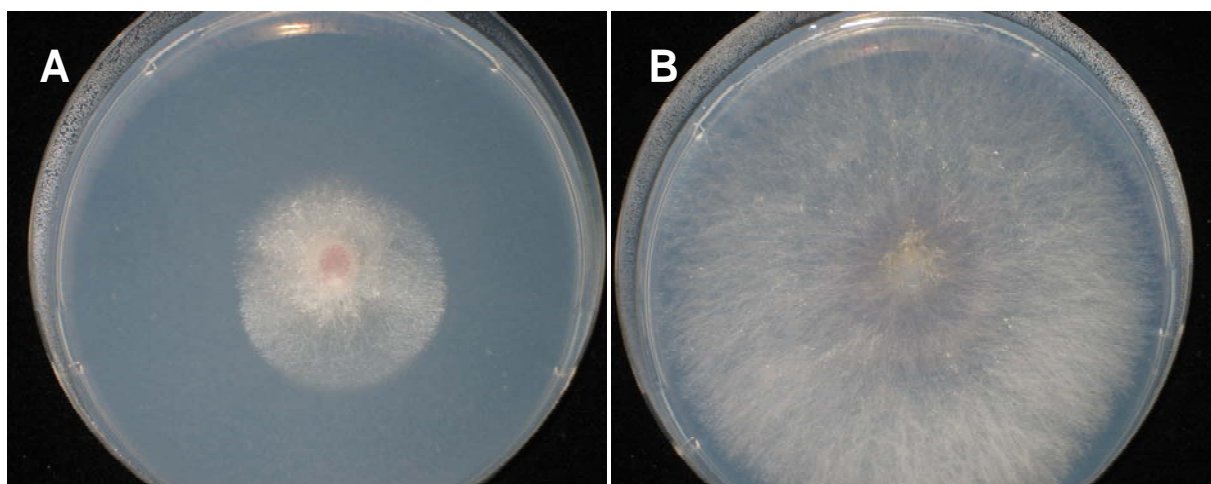


Abb. 24: Kolonien von *F. avenaceum* (A) und *F. graminearum* (B) nach Kultur von fünf Tagen auf SNA

Um nun Aussagen über mögliche ein- oder gegenseitige Beeinflussungen der Pilze untereinander machen zu können, wurden Konfrontationsassays durchgeführt. Hierfür wurden sowohl Wildtypen (nicht dargestellt) als auch unterschiedliche Transformanten einander gegenüber auf SNA-Platten platziert und ihr Wachstumsverhalten dokumentiert. Im ersten Fall wurden ein EGFP- und ein DsRed-Transformant derselben Art, nämlich *F. graminearum*, gemeinsam auf einer Platte kultiviert (Abb. 25).

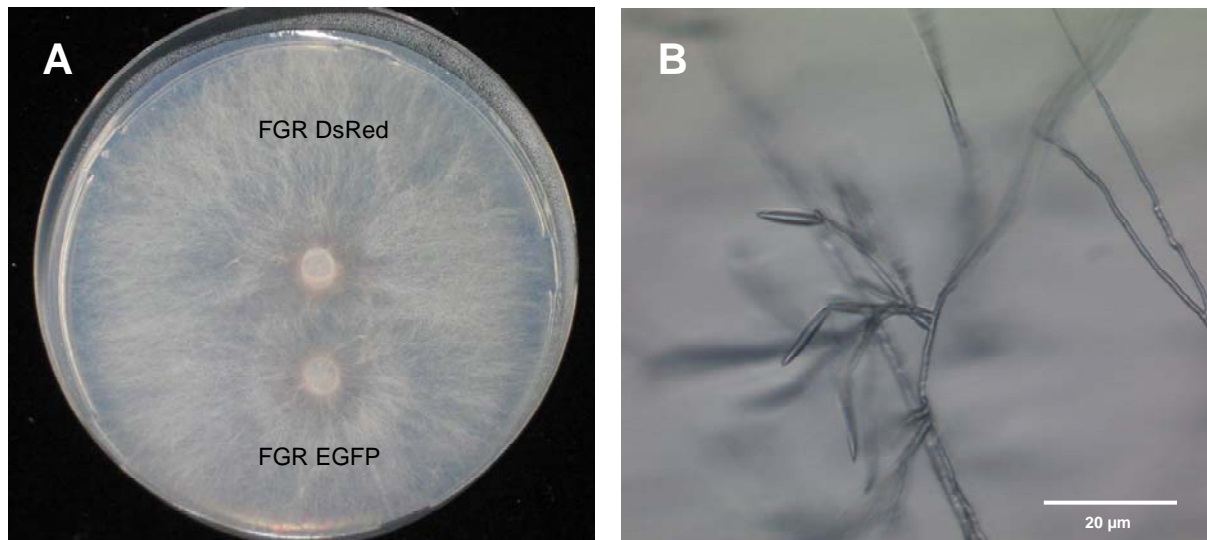


Abb. 25: Konfrontationsassay mit einem EGFP- und einem DsRed-Transformant von *F. graminearum*. (A) SNA-Platte mit den beiden Pilzkulturen, (B) Bildung von Makrokonidien

Dabei konnte keinerlei Beeinträchtigung im Wachstum durch die Gegenwart des jeweils anderen Klons festgestellt werden. Beide Transformanten bildeten wie auch in Einzelkultur Myzel und Luftmyzel und wuchsen in der Mitte der Platte ungehindert aufeinander zu. Unter dem Stereomikroskop konnte auch die Bildung von Makrokonidien beobachtet werden.

Im Zuge fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde in dem Fall, dass ein EGFP-Transformant und ein DsRed-Transformant derselben *Fusarium*-Art gemeinsam kultiviert wurden, das Auftreten zweifarbiger Hyphen im Übergangsbereich zwischen den beiden Kolonien beobachtet (Abb. 26).

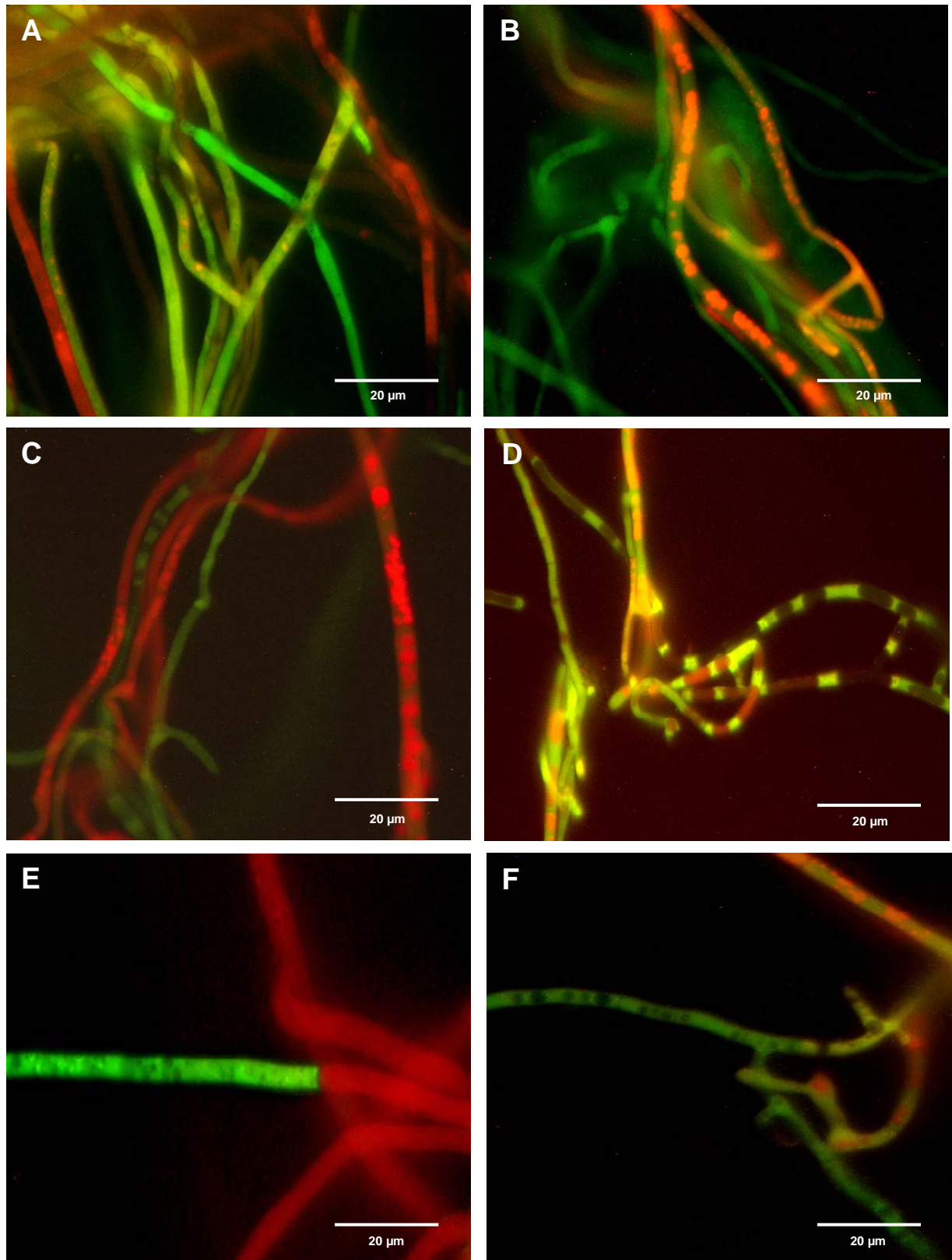


Abb. 26: Zweifarbige Hyphen bei der Kultivierung von *Fusarium* spp., die mit unterschiedlichen Reportergenen transformiert wurden, (B, C, E, F) *Fusarium graminearum* und (A, D) *F. avenaceum*

Bei der gleichzeitigen Kultivierung eines EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und eines DsRed-Transformanten von *F. graminearum* auf einer SNA-Platte war zwischen den beiden Einzelkolonien eine Inhibitionszone des Wachstums zu erkennen. Das Myzel des von Natur aus deutlich schneller wachsenden Klon von *F. graminearum* wuchs ohne erkennbare Beeinträchtigung in einem Bogen um die Kolonie des Klon von *F. avenaceum* herum. Letzterer zeigte auf der dem Transformanten von *F. graminearum* zugewandten Seite ein eingeschränktes Wachstum. In stereomikroskopischen Aufnahmen konnte die Bildung von Makrokonidien durch beide *Fusarium*-Arten dokumentiert werden (Abb. 27).

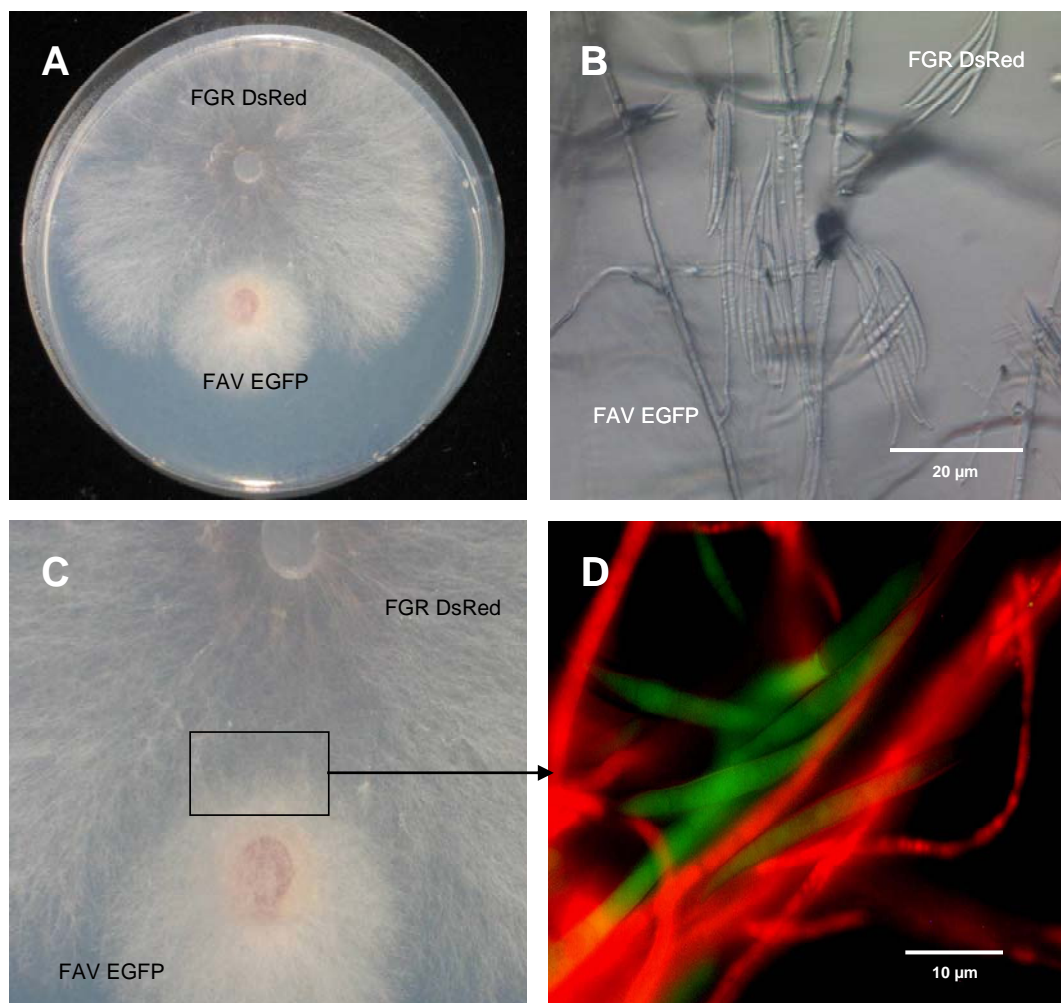


Abb. 27: Konfrontationsassay mit einem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* (FAVEGFP) und einem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed). (A und C) SNA-Platte mit den beiden unterschiedlichen Pilzkulturen, (B) stereomikroskopische Aufnahmen von Makrokonidien der beiden *Fusarium*-Arten, (D) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem Übergangsbereich zwischen der Kolonie des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und des DsRed- Transformanten von *F. graminearum*, überwiegend rotfluoreszierendes Myzel von *F. graminearum* und grünfluoreszierende Hyphe und Makrokonidien von *F. avenaceum* zu erkennen

3.5 Interaktionen zwischen *Fusarium* spp. an Weizen

Da sowohl *F. avenaceum* als auch *F. graminearum* zu dem Erregerkomplex der Partiellen Taubährigkeit gehören, sind ihr Verhalten auf der Wirtspflanze als auch die Interaktionen, die möglicherweise bei einem gemeinsamen Vorkommen auftreten können, von großem Interesse. Hierbei erschien es zunächst sinnvoll, die Entwicklung der einzelnen *Fusarium*-Arten, aber vor allem auch in Koinokulation, anhand der Bestimmung der DNA-Menge zu verfolgen.

3.5.1 Biomasse an Weizenblättern

Zunächst wurden daher Untersuchungen an den Blättern von Weizenpflanzen durchgeführt. Mittels Sprühinokulation wurden die Blätter mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* und deren Kombination inokuliert und das Wachstum der Pilze nach 0, 1, 3, 5 und 7 Tagen mit Real-time PCR quantitativ bestimmt. An den infizierten Blättern wurden keine Symptome einer Infektion mit den *Fusarium*-Arten beobachtet. Auch im Zuge der quantitativen Analyse durch Real-time PCR war es nicht möglich eine Entwicklung der Pilze auf den Weizenblättern zu detektieren.

3.5.2 Biomasse an Weizenähren

3.5.2.1 Makroskopisch sichtbare Entwicklung

Bei der Entwicklung der beiden Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum* einzeln und koinokuliert an Weizenähren zeigten sich schon bei makroskopischer Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten. Nach Infektion der drei mittleren Ährchen durch den DsRed-Transformanten von *F. graminearum* durch Verwendung einer Injektionsnadel traten schon nach etwa zehn Tagen die charakteristischen Symptome der Partiellen Taubährigkeit an einem der inokulierten Ährchen in Form bräunlicher Verfärbungen an den Spelzen auf (Abb. 28).



Abb. 28: Typische Symptome der Partiellen Taubährigkeit in Form ausgebleichter Ährchen elf Tage nach Inokulation mit FGRDsRed (links) und sechzehn Tage nach Inokulation mit der Kombination aus FAVEGFP und FGRDsRed (Mitte und rechts)

Nach etwa fünfzehn Tagen war diese Entwicklung auch an den anderen infizierten Ährchen zu erkennen, die nun ebenfalls eine braune Farbe angenommen hatten. Allerdings war das Auftreten der Symptome auf die drei mittels Injektionsnadel inokulierten Ährchen begrenzt. Der Rest der Ähre durchlief makroskopisch betrachtet die natürliche Entwicklung bis hin zum Abreifen etwa drei Wochen nach Inokulation.

Das Vorhandensein eines Befalls war makroskopisch nach Inokulation mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt oder auch gar nicht erkennbar. Verfärbungen der Ährchen traten nur in einzelnen Fällen auf. Häufig reifte die Ähre auch ohne äußerlich sichtbare Merkmale einer Pilzinfektion durch eine *Fusarium*-Art ab.

Nach der Doppelinokulation mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* waren makroskopisch zwar Krankheitssymptome zu erkennen, aber diese traten deutlich später, etwa sechzehn Tage nach Infektion, in Erscheinung als es nach Einzelinokulation mit dem *F. graminearum* – Transformanten zu beobachten gewesen war (Abb. 28, 29).



Abb. 29: Symptome in Form von Verbräunungen an den infizierten Ährchen sechzehn Tage nach Inokulation durch FAVEGFP, der Kombination aus FAVEGFP und FGRDsRed und FGRDsRed (von links nach rechts)

3.5.2.2 Quantitative Erfassung der Pilzentwicklung

Die Entwicklung der *Fusarium*-Transformanten und ihrer Kombination an Weizenähren wurden nicht nur makroskopisch dokumentiert, sondern das Wachstum wurde vor allem mittels Real-time PCR quantitativ bestimmt. Über einen Zeitraum von insgesamt einundzwanzig Tagen hinweg wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen und die DNA-Menge des jeweiligen infizierenden Pilzes in den drei schon erwähnten Teilstücken (Basis, A, B) der Weizenähren bestimmt.

In den Proben, die an den ersten drei Beprobungszeitpunkten genommen wurden, war es nur an den Ähren, die mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* infiziert worden waren, möglich ein Pilzwachstum nachzuweisen (Abb. 30).

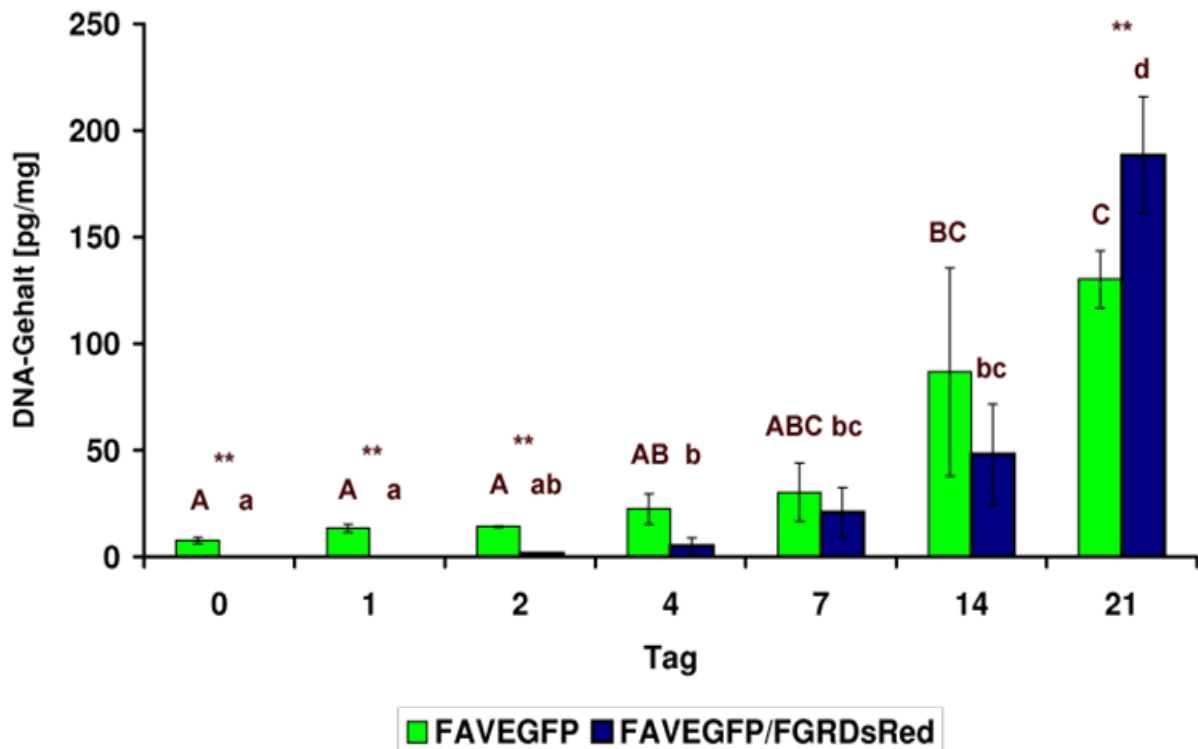


Abb. 30: Quantitative Analyse der Entwicklung des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* (FAVEGFP) einzeln und in Kombination mit dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) mittels Real-time PCR bezogen auf die Trockenmasse über einen Zeitraum von einundzwanzig Tagen (Paarvergleich mit Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$, $n = 6$, Großbuchstaben für FAVEGFP, Kleinbuchstaben für FAVEGFP/FGRDsRed, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Nach Inokulation mit dem EGFP-Transformanten setzte die Entwicklung des Pilzes unmittelbar nach Beginn des Experimentes ein, wohingegen die Infektion mit der Kombination aus diesem Transformanten und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* erst am vierten Tag detektierbar war und letztere zu diesem Zeitpunkt ein geringeres Ausmaß besaß. Im Laufe der folgenden zehn Tage vergrößerte sich die Diskrepanz zwischen den beiden Varianten. Die Analyse ergab am vierten Tag noch 22 pg/mg Trockenmasse für FAVEGFP und 5 pg/mg Trockenmasse für die Kombination, am vierzehnten Tag hingegen schon 87 pg/mg Trockenmasse für FAVEGFP und 48 pg/mg Trockenmasse für die andere Variante.

Einundzwanzig Tage nach Inokulation war eine starke Veränderung in der Verteilung der DNA-Konzentrationen zu verzeichnen. Die Konzentration in den Ähren, die mit FAVEGFP inokuliert worden waren, lag nun mit 130 pg/mg Trockenmasse deutlich niedriger als in denen, die mit der Kombination aus beiden Transformanten infiziert worden waren und nun

einen Wert von 188 pg/mg Trockenmasse aufwies. Der Unterschied zwischen der DNA-Menge von FAVEGFP und der Kombination mit FGRDsRed war signifikant.

Nach Infektion von Weizenähren mit dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* und der Kombination aus diesem und dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* konnte im Laufe der ersten Versuchswoche kein Wachstum der Pilze nachgewiesen werden (Abb. 31).

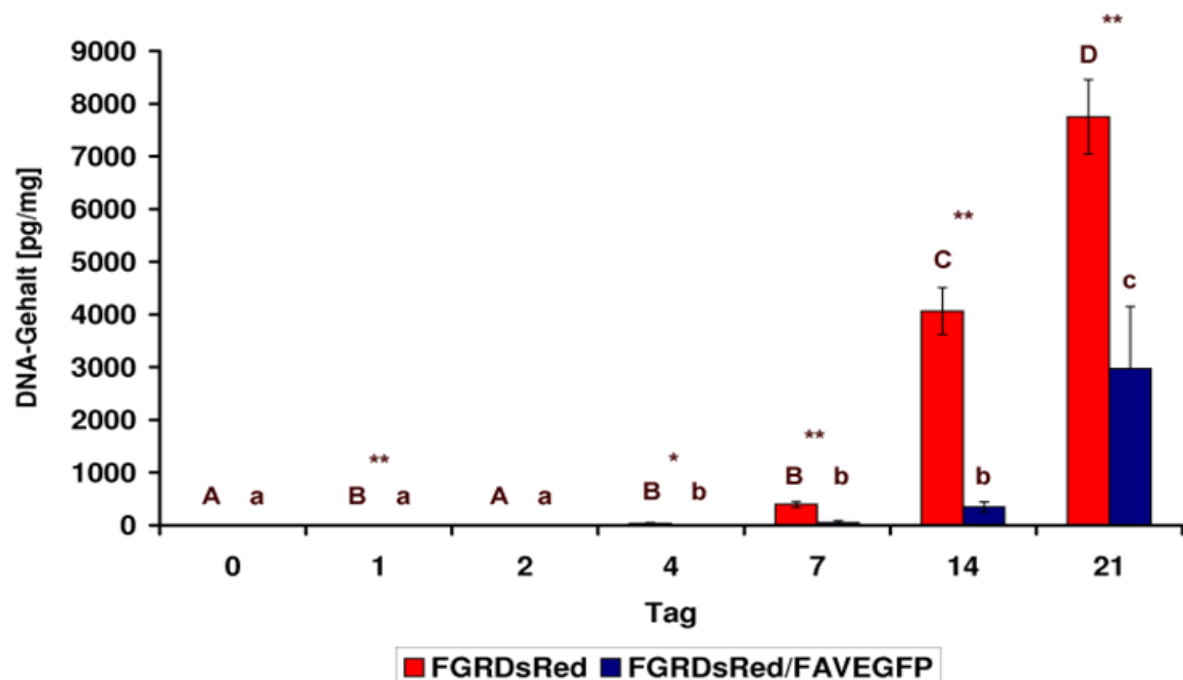


Abb. 31: Quantitative Analyse der Entwicklung des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) einzeln und in Kombination mit dem EGFP Transformanten von *F. avenaceum* (FAVEGFP) mittels Real-time PCR bezogen auf die Trockenmasse über einen Zeitraum von einundzwanzig Tagen (Paarvergleich mit Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$, $n = 6$, Großbuchstaben für FGRDsRed, Kleinbuchstaben für FGRDsRed/FAVEGFP, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Sieben Tage nach Inokulation wurde mittels Real-time PCR für FGRDsRed eine DNA-Menge von 397 pg/mg Trockenmasse in den Weizenähren ermittelt. In den folgenden zwei Wochen stieg die Konzentration auf 4065 pg/mg Trockenmasse am vierzehnten Tag auf 7750 pg/mg Trockenmasse am einundzwanzigsten Tag an. Nach Inokulation mit der Kombination aus den beiden Klonen wurde nur am vierzehnten und am einundzwanzigsten Tag Pilz-DNA detektiert, wobei die Konzentration mit 2973 pg/mg Trockenmasse drei Wochen nach

Inokulation deutlich niedriger war. Die Unterschiede zwischen den beiden Varianten waren an Tag vierzehn und einundzwanzig signifikant.

Neben den gezielt inokulierten Basisstücken der Weizenähren wurden auch die nicht infizierten Teilstücke oberhalb (A) und unterhalb (B) der Basis mittels Real-time PCR analysiert, um eine eventuelle Entwicklung der Pilze auch in diesen Bereichen der Ähre anhand der DNA-Menge quantifizieren zu können. Ein über das Basisstück hinausgehendes Wachstum konnte allerdings nur nach Inokulation mit dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* oder der Kombination mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* bei Detektion auf *F. graminearum* in der Real-time PCR festgestellt werden. DNA von *F. avenaceum* wurde in keinem der Teilstücke nachgewiesen.

Nach Einzelinokulation mit FGRDsRed wurde in Teilstück B vierzehn Tage nach Inokulation eine DNA-Konzentration von 1271 pg/mg Trockenmasse ermittelt und einundzwanzig Tage später 1865 pg/mg Trockenmasse. In Teilstück A wurde keine DNA von *F. graminearum* nachgewiesen (Tab. 6).

Tab. 6: Quantitative Analyse der Entwicklung des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) im nicht inokulierten Teilstück B von Weizenähren über einen Zeitraum von einundzwanzig Tagen (Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$, $n = 6$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Tag	DNA-Menge [pg/mg]
0	0,00
1	0,00
2	0,00
4	1,81 a
7	0,00
14	1270,83 b
21	1865,38 c

Nach Infektion mit der Kombination aus den beiden Transformanten wurden nach Detektion von *F. graminearum* mittels Real-time PCR einundzwanzig Tage nach Inokulation sowohl in Teilstück A als auch in Teilstück B DNA-Mengen ermittelt (Tab. 7).

Tab. 7: Quantitative Analyse der Entwicklung des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) in Teilstücken A und B (inokuliert mit der Kombination aus dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum*) über einen Zeitraum von einundzwanzig Tagen (Paarvergleich mit Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$ $n = 6$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Tag	Teilstück A DNA-Menge [pg/mg]	Teilstück B DNA-Menge [pg/mg]	p-Werte
0	0,00	0,00	1
1	0,00	0,00	1
2	0,00	0,00	1
4	0,00	0,00	1
7	0,00	0,00	1
14	0,00	0,74	1
21	241,09 a	782,73 b	0,02

In Teilstück B war mit 783 pg/mg Trockenmasse eine höhere DNA-Konzentration zu detektieren als in Teilstück A mit 241 pg/mg Trockenmasse.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich sowohl der EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* als auch der DsRed-Transformanten von *F. graminearum* in den Ähren entwickeln. Allerdings hat das Vorhandensein des jeweils anderen in den Koinokulationsvarianten auf die beiden *Fusarium*-Arten eine vollkommen unterschiedliche Wirkung. Im Falle des Transformanten von *F. avenaceum* war ein deutlich erhöhter DNA-Gehalt zu verzeichnen, bei dem Transformanten von *F. graminearum* hingegen wurde ein reduziertes Wachstum beobachtet.

3.5.3 Einfluss der verschiedenen Inokulationsvarianten auf die Mykotoxin-Produktion in Weizenähren

Eine der wichtigsten Eigenschaften, die die beiden *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* auszeichnet, ist die Produktion von Mykotoxinen. Es ist sehr gut vorstellbar, dass bei der Produktion dieser Sekundärmetabolite gegenseitige Beeinflussung dieser beiden Arten festzustellen sein könnten. Aus diesem Grund wurden von den Proben, die einundzwanzig Tage nach Inokulation mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* oder deren Kombination genommen worden waren, von jeder Inokulationsvariante Analysen der gebildeten Mykotoxine durchgeführt. Detektiert wurden die Mykotoxine Enniatin B, Moniliformin, Fusarenon X, Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (NIV). Nur in den Ähren, die mit der Kombination aus

beiden Transformanten inokuliert worden waren, wurden alle fünf Mykotoxine gebildet (Abb. 32).

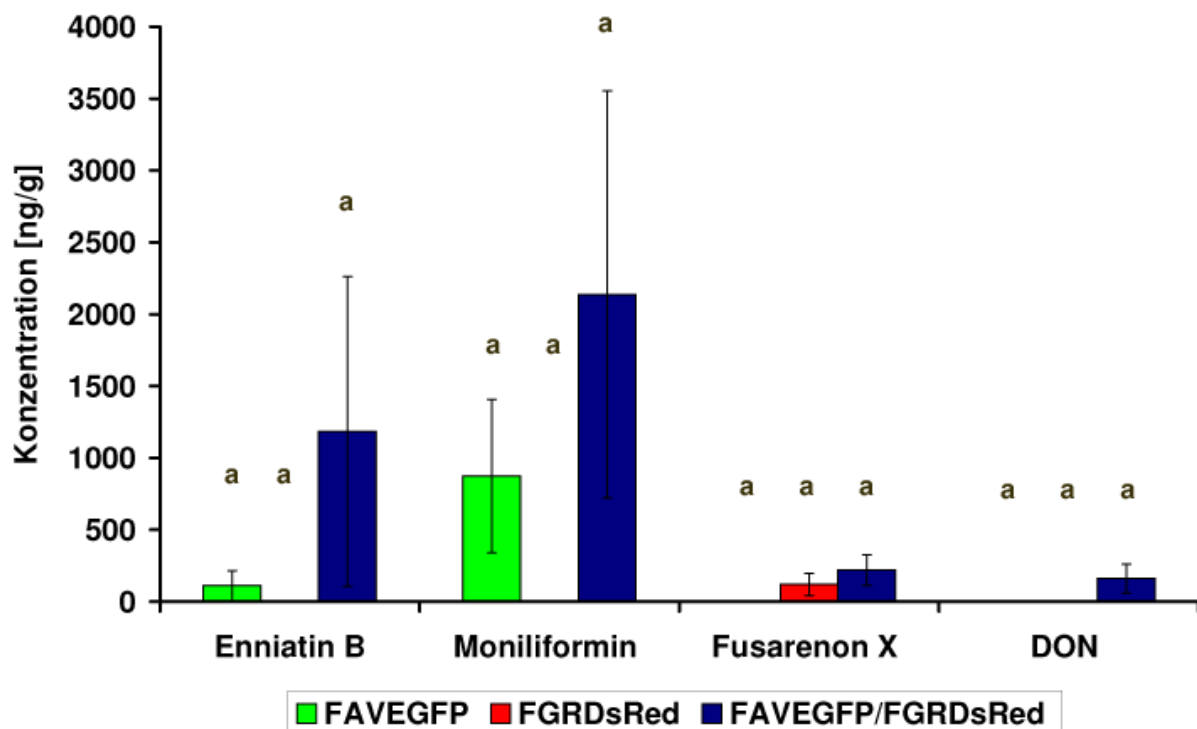


Abb. 32: Analyse der Mykotoxine Enniatin B, Moniliformin, Fusarenon X und Deoxynivalenol (DON) in Weizenähren inokuliert mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* (FAVEGFP), dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) und der Kombination aus beiden Transformanten einundzwanzig Tage nach Inokulation (Enniatin B, Moniliformin, Fusarenon X: T-Test, DON: Mann-Whitney-U-Test, $p \leq 0,05$, $n = 6$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Sowohl Enniatin B als auch Moniliformin wurden nur in Ähren produziert, die entweder mit FAVEGFP oder dessen Kombination mit FGRDsRed inokuliert worden waren. Im Vergleich waren die Werte für die erste Inokulationsvariante für beide Mykotoxine mit einer Konzentration von 111 ng/g für Enniatin B und 874 ng/g für Moniliformin deutlich niedriger als für die Kombinationsvariante mit einer Konzentration von 1184 ng/g für Enniatin B und 2137 ng/g für Moniliformin. Fusarenon X hingegen wurde neben den Proben, die mit der Kombination inokuliert worden waren, in denjenigen detektiert, die mit FGRDsRed infiziert worden waren. Auch hier lag der Wert für die Konzentration in der Kombinationsvariante mit 219 ng/g höher als in der Einzelvariante mit 119 ng/g. Deoxynivalenol wurde nur in den Proben nachgewiesen, die mit der Kombination aus beiden Transformanten inokuliert worden waren. Die Mykotoxin-Konzentration betrug hier 160 ng/g. Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Mykotoxine waren jedoch nicht signifikant.

Die größte Rolle spielte bei den drei Infektionsvarianten allerdings das Trichothecen Nivalenol. Da dieses Mykotoxin nur von Isolaten der Art *F. graminearum* und nicht von *F. avenaceum* gebildet werden kann, wurde es nur in den Ähren detektiert, die mit dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* oder der Kombination mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* inokuliert worden waren. Das Trichothecen Nivalenol wurde in den mit Abstand höchsten Konzentrationen produziert und wird aus diesem Grund gesondert dargestellt (Abb. 33).

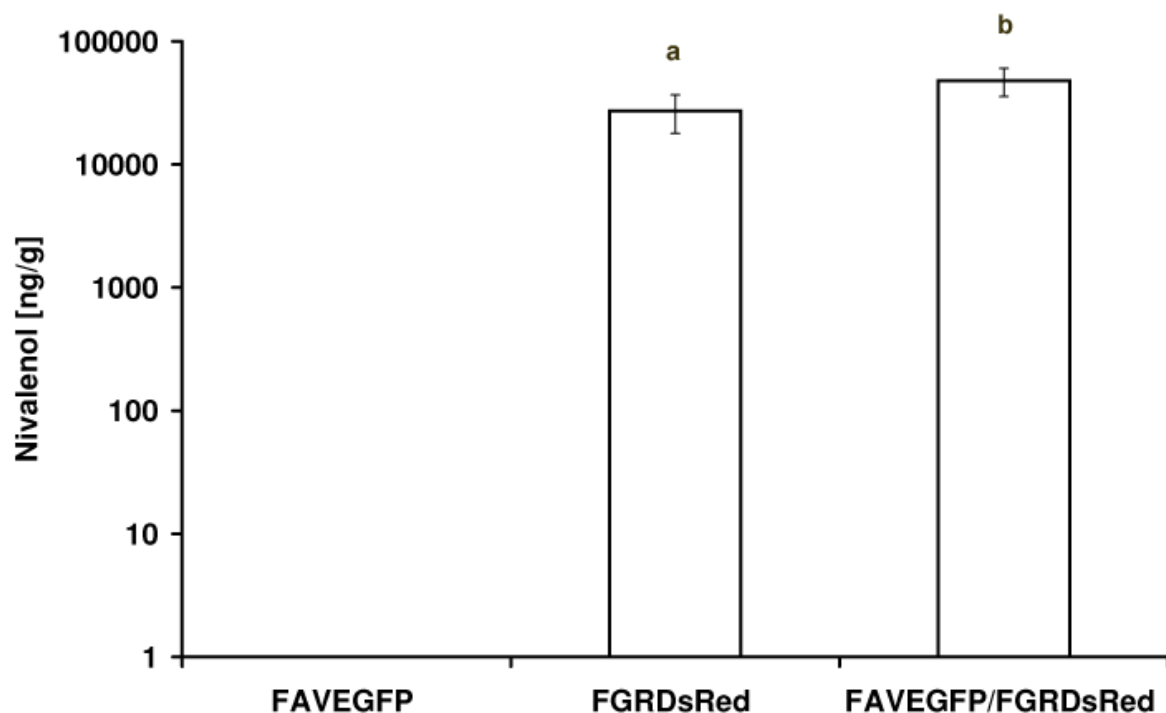


Abb. 33: Konzentration an Nivalenol (NIV) in Weizenähren inokuliert dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* (FAVEGFP), dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) und der Kombination aus beiden Transformanten einundzwanzig Tage nach Inokulation (T-Test, $p \leq 0,05$, $n = 5$, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an)

Die Konzentration von Nivalenol betrug 32783 ng/g war in den Ähren, die mit FGRDsRed infiziert worden waren. Bei FAVEGFP lag der Wert für die Nivalenol-Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze, die auf 12 ng/g festgesetzt worden war. Dies war zu erwarten, da *F. avenaceum* kein Nivalenol produzieren kann. Für die Variante, die mit einer Mischung der beiden Transformanten infiziert worden war, lag der Wert für die Konzentration mit 55285 ng/g um 41% höher als bei der Einzelvariante mit FGRDsRed. Die Unterschiede waren signifikant.

Insgesamt zeigte sich die Tendenz, dass die Anwesenheit einer anderen *Fusarium*-Art sowohl bei *F. avenaceum* als auch bei *F. graminearum* zu einer gesteigerten Produktion von Mykotoxinen führt.

3.5.4 Sensitivität von *Fusarium* spp. für Trichothecene

Isolate der Pilzart *F. graminearum* unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Mykotoxine aus der Familie der Trichothecene zu bilden. Sie gehören entweder zu der Chemotyp-Gruppe, die Deoxynivalenol bildet (DON-Bildner), oder sie werden aufgrund ihrer Fähigkeit Nivalenol zu bilden, in die Chemotyp-Gruppe der NIV-Bildner eingeordnet. Um die möglichen Auswirkungen dieser beiden Mykotoxine auf das Wachstum und die Entwicklung einer trichothecenbildenden Art, *F. graminearum*, und einer Art, die dies nicht tut, *F. avenaceum*, zu untersuchen, wurden Sensitivitätstests durchgeführt. In die Mitte der Oberfläche dieser Agar-Platten wurde ein mykotoxinhaltiges Agarstück mit jeweils 10 mg/ml Mykotoxin-Konzentration und einem Durchmesser von 5 mm gesetzt und das Wachstum der Pilze dokumentiert (Abb. 34 und 35).

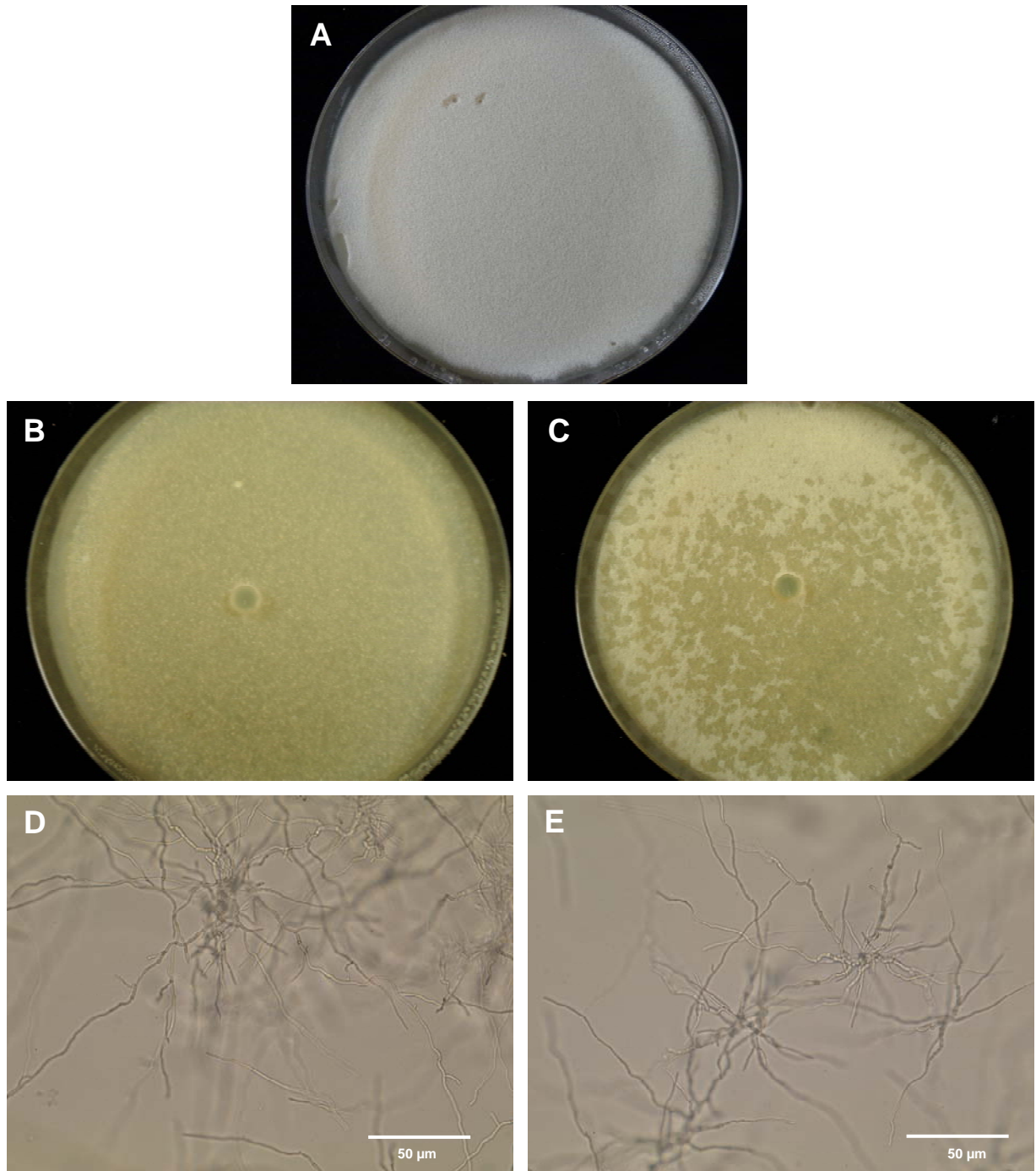


Abb. 34: Einfluss der beiden Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (NIV) auf das Wachstum von *F. avenaceum* auf PDA: (A) unbehandelte Kontrolle auf PDA, Wildtyp auf PDA mit DON, (C) Wildtyp auf PDA mit NIV, (D) Myzel in unmittelbarer Nähe des mit DON versetzten Agarstücks, (E) Myzel in unmittelbarer Nähe des mit NIV versetzten Agarstücks

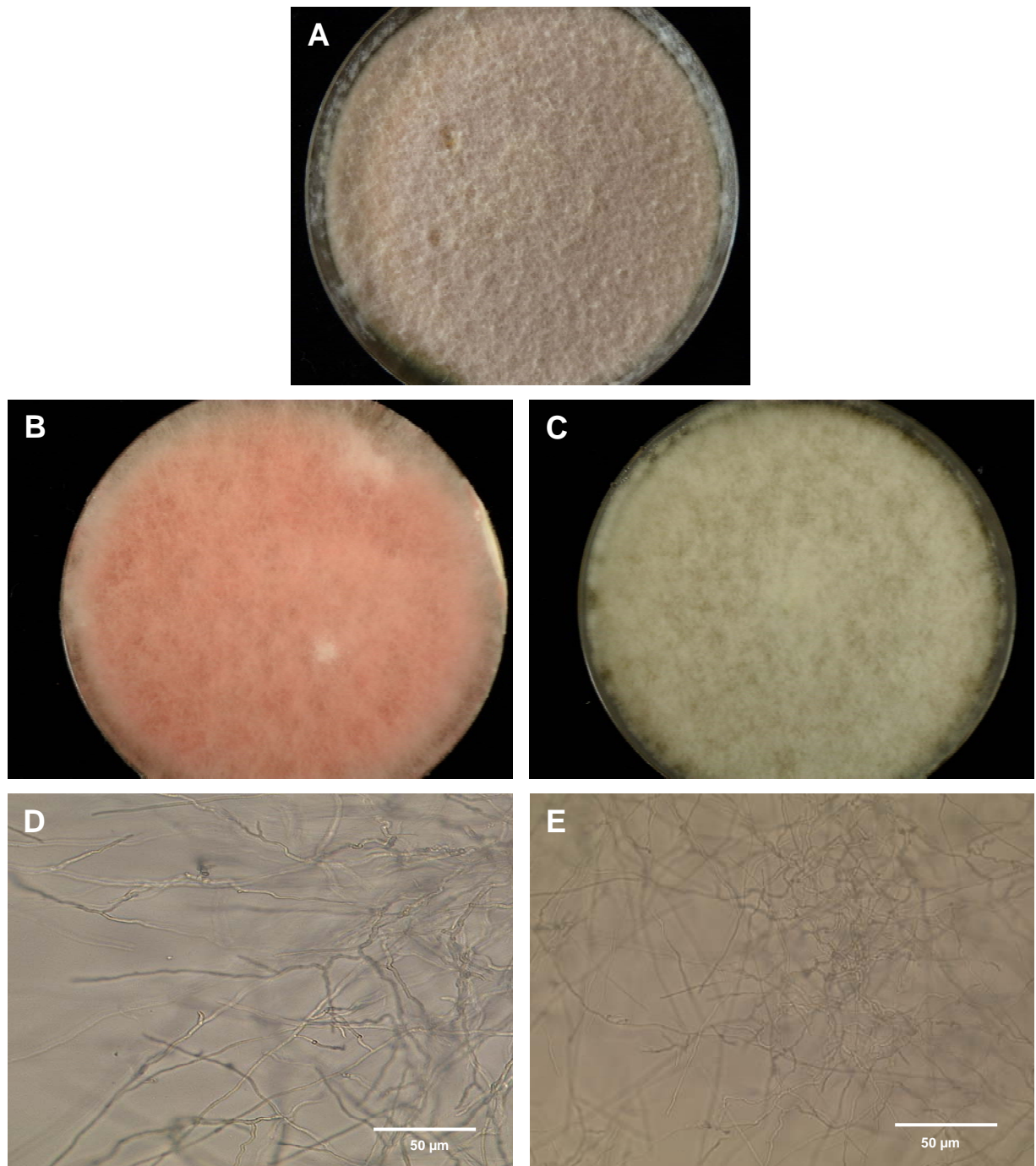


Abb. 35: Einfluss der beiden Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (NIV) auf das Wachstum von *F. graminearum* auf PDA: (A) unbehandelte Kontrolle auf PDA, (B) Wildtyp auf PDA mit DON, (C) Wildtyp auf PDA mit Nivalenol, (D) Myzel in unmittelbarer Nähe des mit DON versetzten Agarstücks, (E) Myzel in unmittelbarer Nähe des mit NIV versetzten Agarstücks

Weder Nivalenol noch Deoxynivalenol zeigten eine makroskopisch oder mikroskopisch sichtbare Wirkung auf das Wachstum von *F. avenaceum* und *F. graminearum*. Die in dem festen Nährmedium vorhandenen Konidien beider *Fusarium*-Arten keimten aus und bildeten auf der Agaroberfläche ein vollkommen gleichmäßiges Netzwerk aus Myzel. Um das

mykotoxinhaltige Agarstückchen in der Mitte der Platte wurde keine Hemmzone des Wachstums oder ein Einfluss auf die Ausbildung der Hyphen beobachtet.

3.5.5 Einfluss von Ferulasäure auf die Pilzentwicklung

Pflanzliche Sekundärmetabolite, für das Überleben nicht essentielle Stoffwechselprodukte des Sekundärstoffwechsels, besitzen nachgewiesener Maßen die Fähigkeit, die Mykotoxin-Biosynthese zu beeinflussen (Boutigny et al. 2009). Die Zellwände monokotyler Pflanzen enthalten eine Reihe alkalilabiler, phenolischer Verbindungen, insbesondere Ferulasäure, die über Esterbindungen mit dem Arabinoxylan der Zellwände vernetzt ist. Aufgrund der Ergebnisse der Mykotoxin-Analysen der Weizenähren, die mit einem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, einem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* und der Kombination aus diesen beiden Klonen inokuliert worden waren, wurde der Zusammenhang zwischen Mykotoxin-Biosynthese und dem Abbau von Ferulasäure in den Ähren untersucht.

3.5.5.1 Sensitivität von *Fusarium* spp. auf Ferulasäure

Zunächst wurde das Wachstum der Wildtypen von *F. avenaceum* und *F. graminearum* und deren Transformanten auf Agar untersucht, der mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ferulasäure versetzt worden war. Dieses Experiment diente dazu, eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Konzentrationen an Ferulasäure eine wachstumshemmende Wirkung auf die beiden *Fusarium*-Arten ausübten. Nach fünf Tagen wurde der Radius der Kolonien abzüglich des Animpfstücks gemessen, um einen Eindruck von der Sensitivität der Pilze auf die Wirkung von Ferulasäure zu erhalten (Abb. 36 und 37).

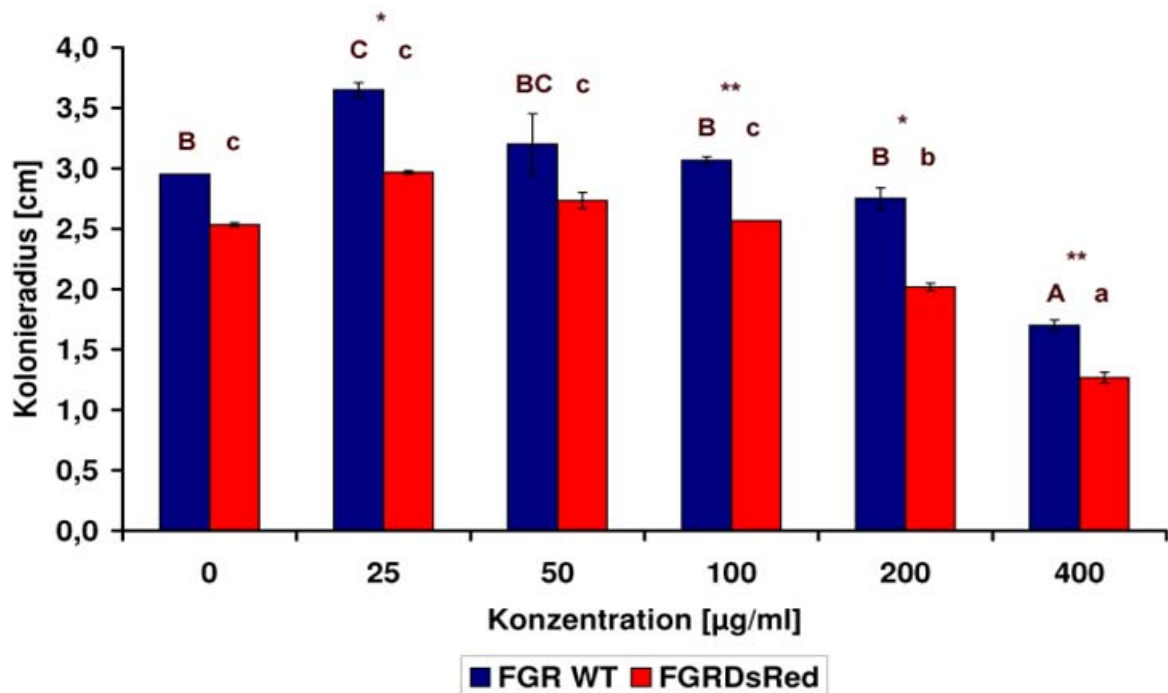


Abb. 36: Wachstum von Wildtyp und Transformant von *F. graminearum* (FGRWT und FGRDsRed) auf mit Ferulasäure versetztem Agar fünf Tage nach Inokulation, (Tukey-Test, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen je Wildtyp (Großbuchstaben) bzw. Transformant (Kleinbuchstaben) an, $p \leq 0,05$, Sternchen kennzeichnen den Paarvergleich zwischen Wildtyp und Transformant, $n = 3$)

Auffallend war, dass eine Ferulasäure-Konzentration von 25 µg/ml das Wachstum von Wildtyp und Transformant von *F. graminearum* förderte. Bei dem Wildtyp stieg der Wert von 3 cm Kolonieradius um etwa 19% auf 3,7 cm Kolonieradius an, bei dem DsRed-Transformanten hingegen von 2,5 cm Kolonieradius um etwa 17% auf 3 cm Kolonieradius an.

Der Wildtyp von *F. avenaceum* begann erst bei einer Ferulasäure-Konzentration von 200 µg/ml eine Hemmung im Wachstum zu zeigen (Abb. 37).

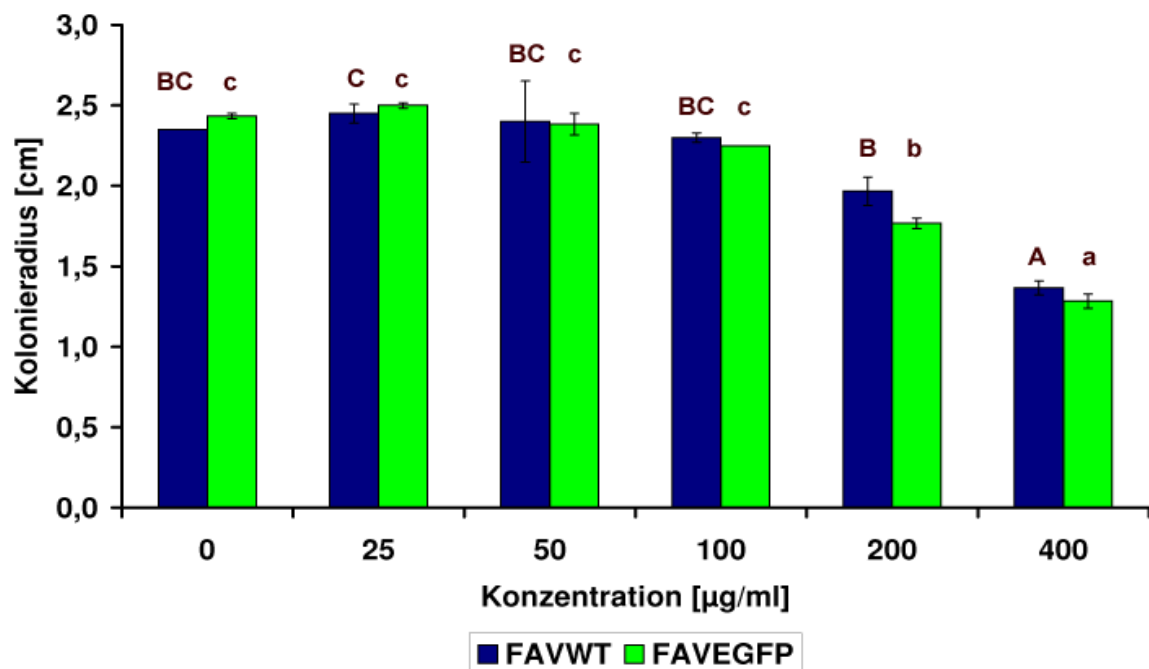


Abb. 37: Wachstum von Wildtyp und Transformant von *F. avenaceum* (FAVWT und FAVEGFP) auf mit Ferulasäure versetztem Agar fünf Tage nach Inokulation, (Tukey-Test, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen je Wildtyp (Großbuchstaben) bzw. Transformant (Kleinbuchstaben) an, $p \leq 0,05$, $n = 3$)

Bei einer Konzentration von 400 µg/ml war dies am besten zu erkennen. Von 2,5 cm Kolonieradius bei einer Konzentration von 25 µg/ml war der Wert um 44% auf 1,4 cm Kolonieradius abgesunken (Abb. 38).

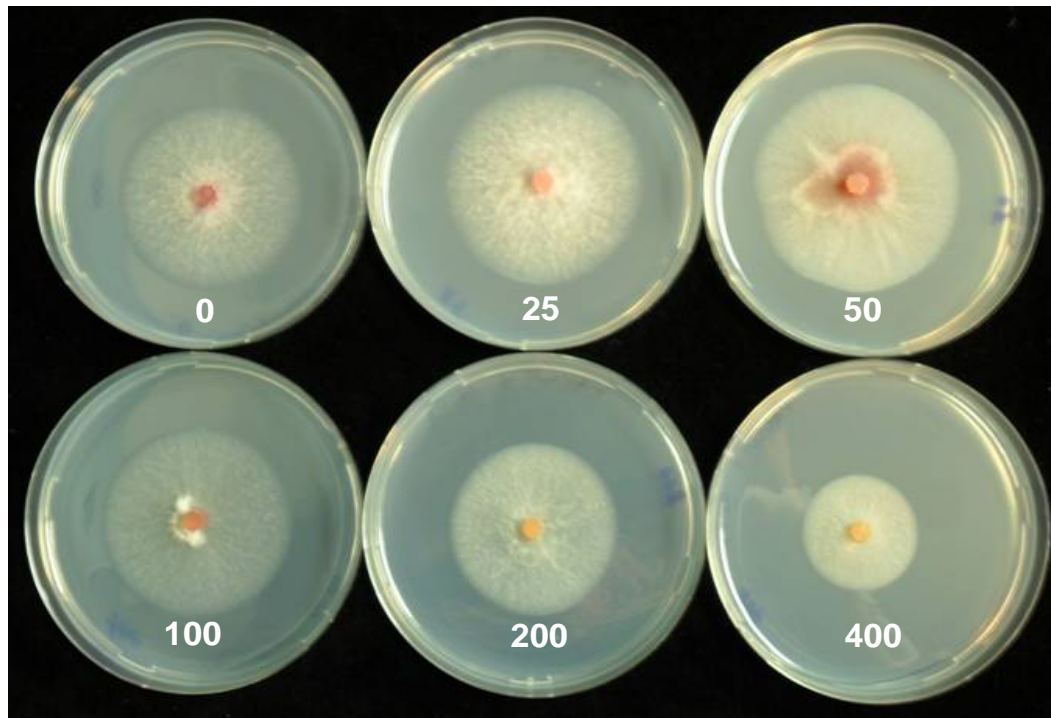


Abb. 38: Wachstum des Wildtypen von *F. avenaceum* auf mit Ferulasäure versetztem Agar ansteigender Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) fünf Tage nach Inokulation

Das Wachstum des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* wies einen sehr ähnlichen Verlauf auf. Hier sank der Wert für das Koloniewachstum ebenfalls mit steigender Konzentration an Ferulasäure ab (Abb. 39).

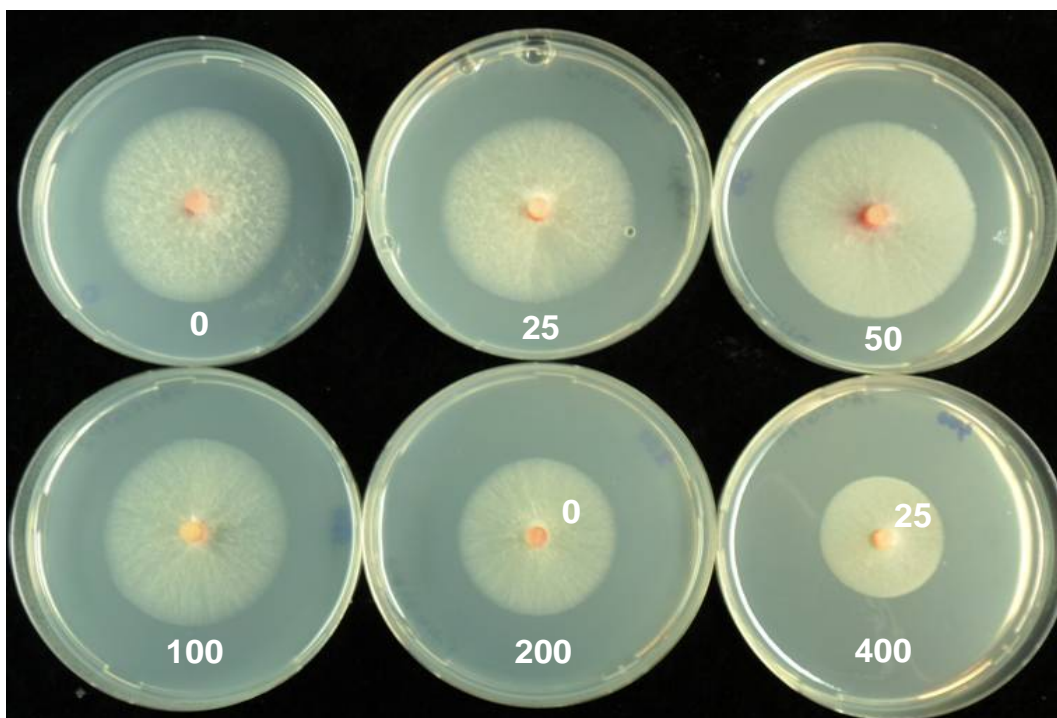


Abb. 39: Wachstum des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* auf mit Ferulasäure versetztem Agar ansteigender Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) fünf Tage nach Inokulation

Die höchsten Wachstumsradien traten bei dem Wildtyp von *F. graminearum* auf. Der Radius der Kolonien betrug hier bei einer Konzentration von 25 µg/ml Ferulasäure 3,7 cm und sank dann um etwa 54% auf 1,7 cm bei 400 µg/ml Ferulasäure im Agar, wobei auch schon bei 200 µg/ml ein deutlicher Rückgang des Wachstums zu verzeichnen war (Abb. 40).

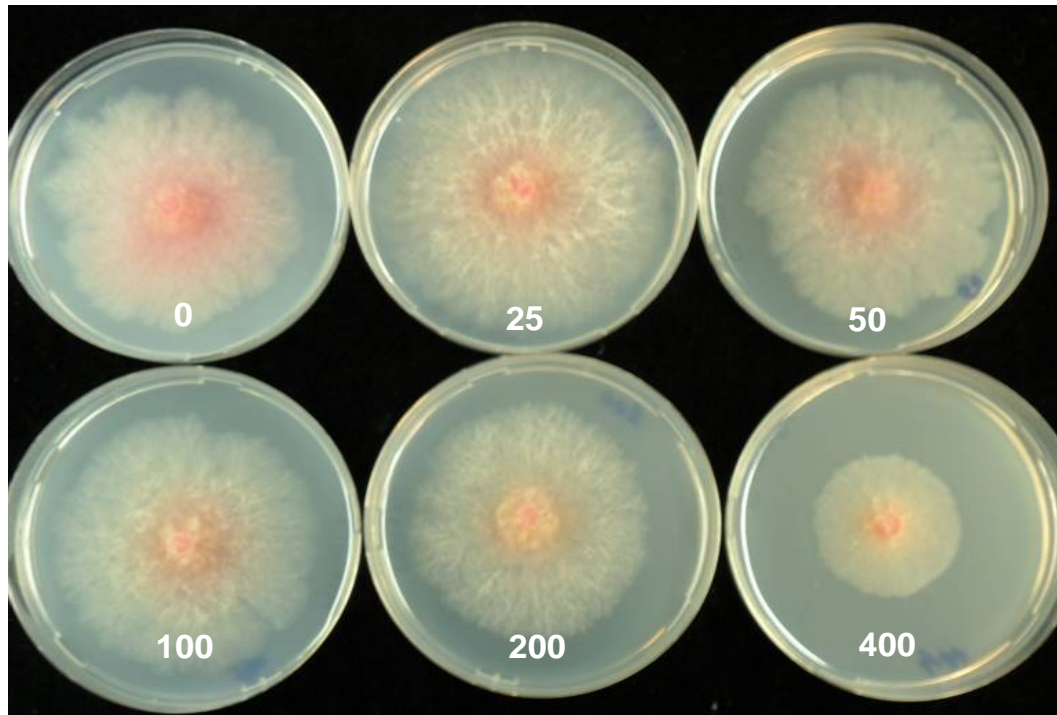


Abb. 40: Wachstum des Wildtypen von *F. graminearum* auf mit Ferulasäure versetztem Agar ansteigender Konzentration (µg/ml) fünf Tage nach Inokulation

Bei dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* zeigte sich die gleiche Tendenz wie bei dem Wildtypen. Der Werte sanken von dem Maximum von 3 cm Kolonieradius bei einer Ferulasäure-Konzentration von 25 µg/ml stetig auf 2 cm bei 200 µg/ml und schließlich auf 1,3 cm Radius bei einer Konzentration von 400 µg/ml ab (Abb. 41).

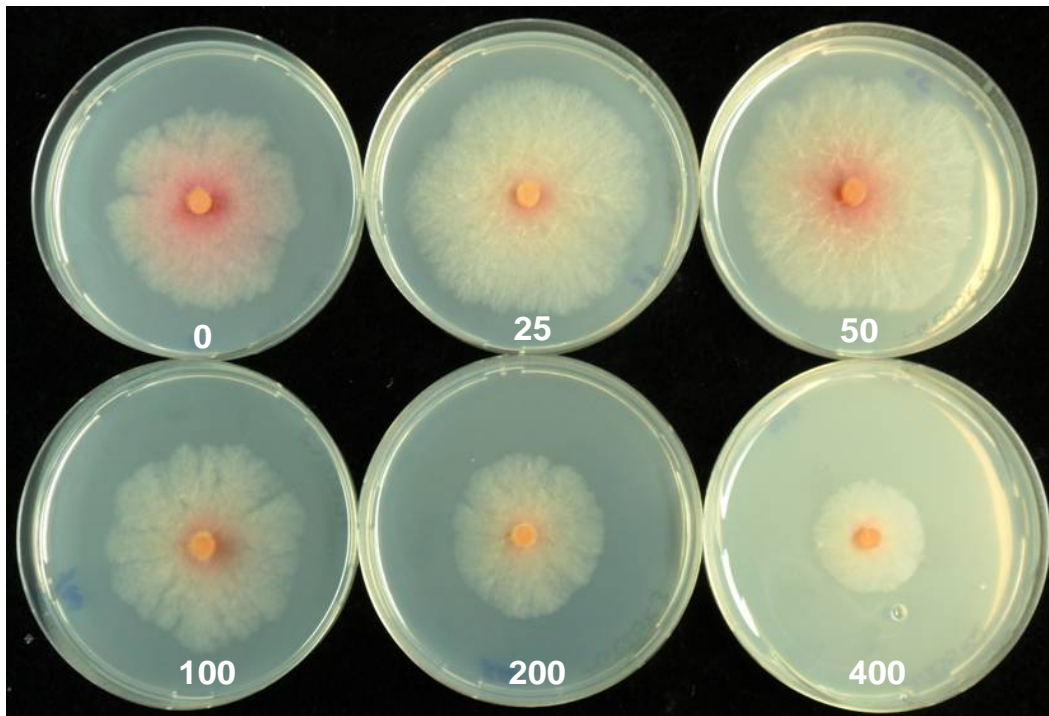


Abb. 41: Wachstum des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* auf mit Ferulasäure versetztem Agar ansteigender Konzentration (µg/ml) fünf Tage nach Inokulation

3.5.5.2 Abbau von Ferulasäure *in vitro* durch *Fusarium* spp.

In diesem Versuch wurden aus den Agarplatten mit 400 µg/ml Ferulasäure, die im oben beschriebenen Sensitivitätstest vermessen worden waren, sowohl aus den von Pilzmyzel bewachsenen als auch aus den unbewachsenen Teilen Agarstücke entnommen. Der in diesen noch von den anfänglichen 400 µg/ml enthaltene Anteil an Ferulasäure wurde mit Hilfe von Ethanol extrahiert und mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) quantitativ bestimmt. Unter Einbeziehung der zuvor erstellten Eichgeraden, dem Gewicht des jeweiligen Agarstücks und dem durch HPLC ermittelten Wert für die Konzentration der Ferulasäure in den unterschiedlichen Agarstücken wurde der in dem Medium verbliebene Gehalt an Ferulasäure in Prozent errechnet (Abb. 42).

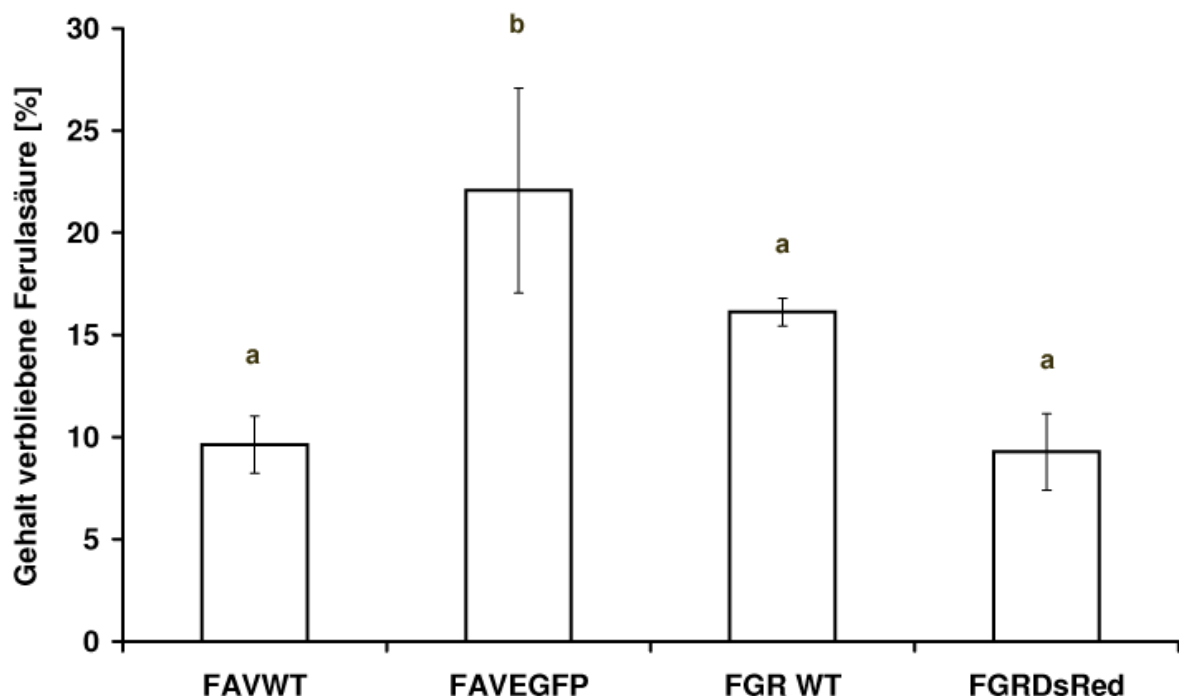


Abb. 42: Gehalt an in Agarplatten verbliebener Ferulasäure nach fünftägigem Wachstum von Wildtypen und Transformanten von *F. avenaceum* (FAVWT und FAVEGFP) und *F. graminearum* (FGRWT und FGRDsRed) (Tukey-Test, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolaten an, $p \leq 0,05$, $n = 3$)

Generell zeigte sich bei dem Wildtypen und bei dem Transformanten von *F. avenaceum* ein Zusammenhang zwischen dem Radius der Pilzkolonie und dem Gehalt an Ferulasäure, der noch im Agar nachgewiesen werden konnte. Je größer die entstandene Kolonie war, desto stärker wurde die Ferulasäure abgebaut. Der Wildtyp von *F. avenaceum* wies einen Kolonieradius von 1,4 cm auf, und es wurde noch ein Gehalt von 10% Ferulasäure im Agar

nachgewiesen. Der EGFP-Transformant hingegen besaß einen Radius von 1,3 cm und einen Ferulasäure-Gehalt von 22%, also 78% Abbau, im Agar. Der Unterschied war signifikant.

Bei *F. graminearum* war ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Kolonieradius und Ferulasäure-Gehalt zu verzeichnen. Die Kolonie des Wildtypen wies einen Radius von 1,7 cm auf und es wurden noch 16% der im Agar enthaltenen Ferulasäure detektiert. Es waren 84% der Substanz durch den Pilz abgebaut worden. Der DsRed-Transformant hingegen hatte bei einem Kolonieradius von 1,3 cm 91% der Ferulasäure abgebaut, es verblieben 9% im Agar. In diesem Fall gab es keinen signifikanten Unterschied.

Insgesamt wurde im Laufe dieser Untersuchungen ermittelt, dass sowohl die Wildtypen als auch die beiden Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum* erst durch eine Ferulasäure-Konzentration von 400 µg/ml signifikant im Wachstum gehemmt werden, und dass sie in der Lage sind Ferulasäure abzubauen.

3.5.5.3 Einfluss von *Fusarium* ssp. auf den Gehalt an Ferulasäure in Ähren

Nach diesen *in vitro*-Untersuchungen zur Fähigkeit der beiden *Fusarium*-Arten unter dem Einfluss von Ferulasäure zu wachsen und diese abzubauen wurde der Gehalt dieses Sekundärmetabolits in inokulierten Ähren mittels HPLC ermittelt. Aus den drei Teilstücken der Weizenähren (A, Basis, B), die mit einem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und einem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* inokuliert und bereits mit Real-time PCR als auch mittels Mykotoxin-Analyse untersucht worden waren, wurde die lösliche Ferulasäure mit Methanol und die zellwandgebundene Ferulasäure mit Natronlauge und Ethylacetat extrahiert. In den Ährenproben wurde keine lösliche Ferulasäure nachgewiesen.

Generell wurde in allen drei Teilstücken der Ähren im Vergleich zur Kontrolle ein geringerer Gehalt an in den Zellwänden über Esterbindungen gebundener Ferulasäure detektiert (Abb. 43).

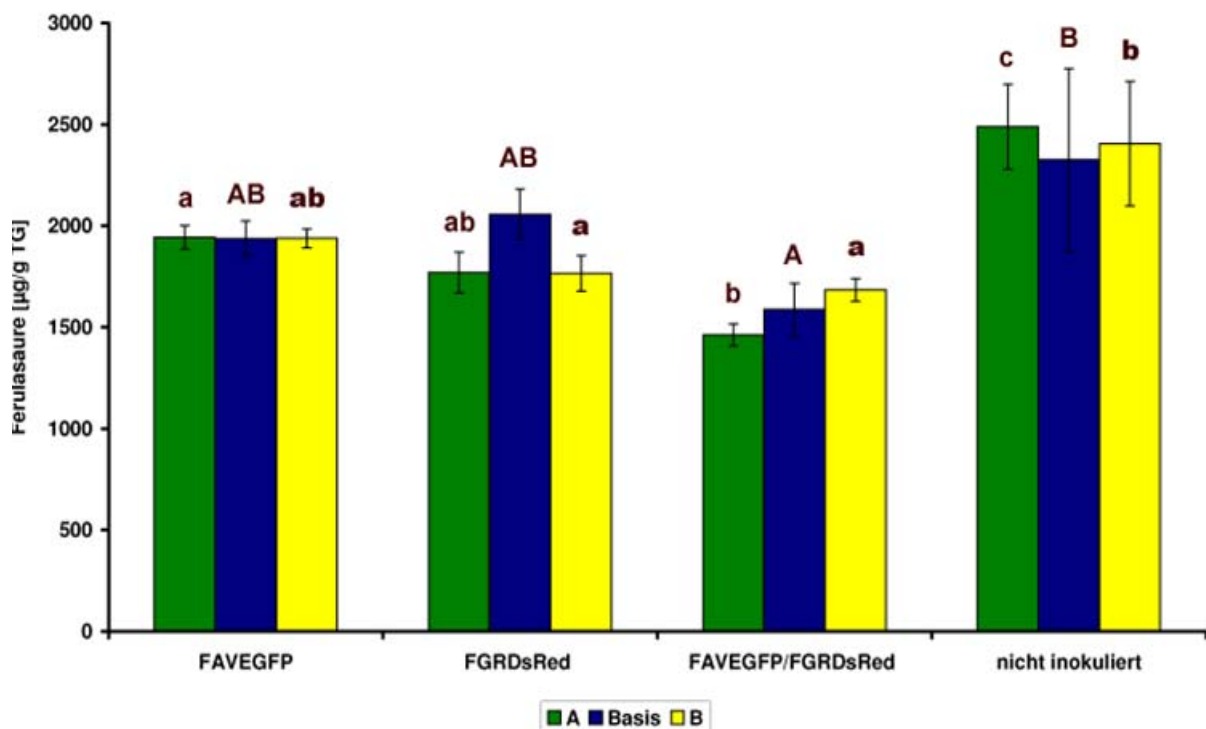


Abb. 44: Gehalt an zellwandgebundener Ferulasäure in Teilstücken von Weizenähren (A, Basis, B) inokuliert mit einem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* (FAVEGFP), einem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* (FGRDsRed) und der Kombination aus beiden Klonen, einundzwanzig Tage nach Inokulation (LSD-Test, gleiche Buchstaben zeigen nicht signifikante Unterschiede an, Kleinbuchstaben: Ährenabschnitt unterhalb des inokulierten Abschnitts (A), Großbuchstaben: inokulierter Abschnitt (Basis), fettgedruckte Kleinbuchstaben: Ährenabschnitt oberhalb des inokulierten Abschnitts (B), n = 6)

In der Basis wurde in der Kontrolle im Vergleich zur koinokulierten Variante ein signifikant höherer Gehalt an Ferulasäure ermittelt, zu der mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* hingegen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Teilstücke A der Ähren, die mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* inokuliert worden waren, wiesen im Vergleich zur koinokulierten Variante einen signifikant höheren und verglichen mit der Kontrolle einen signifikant niedrigeren Gehalt an Ferulasäure auf. In den Teilstücken B wurden in den Ähren, die mit dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* und in denen, die mit dessen Kombination mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* inokuliert worden waren, signifikant niedrigere Ferulasäure-Gehalte detektiert. Im Gegensatz dazu gab es zwischen den Ähren, die mit dem EGFP-Transformanten von *F.*

avenaceum infiziert worden waren und den anderen beiden Varianten und der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede.

Im Zuge dieses Experimentes wurde klar, dass in Ähren, die mit einer Kombination aus dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* inokuliert worden waren, sowohl in der inokulierten Basis als auch in den nicht inokulierten Teilstücken signifikant niedrigere Gehalt an Ferulasäure detektiert wurden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf Sommerweizen gelegt, an dem ein Komplex aus insgesamt siebzehn verschiedenen *Fusarium*-Arten die Partielle Taubährigkeit verursacht. Diese Krankheit wird in Mitteleuropa zuvörderst von *F. graminearum* (*Gibberella zeae*) hervorgerufen, aber auch *F. avenaceum* (*Gibberella avenacea*), *F. culmorum* und *F. poae* spielen eine entscheidende Rolle (Parry et al., 1995; Xu et al., 2004). Abgesehen von den Ertragsverlusten durch die Bildung von Kümmerkorn besteht das größte volkswirtschaftliche Problem, das sich durch die Infektion des Getreides mit diesen pathogenen Pilzen ergibt, darin, dass *Fusarium*-Arten unter bestimmten Bedingungen verschiedene Mykotoxine bilden und das Erntegut damit kontaminieren und unbrauchbar machen (Xu et al., 2007).

Reporterproteine eingesetzt zur Markierung von *Fusarium* spp.

Da die Partielle Taubährigkeit durch ein Zusammenspiel mehrerer verschiedener *Fusarium*-Arten entsteht, wurde untersucht, ob Interaktionen zwischen einzelnen Arten dieser Pilzgattung auftraten. Hierfür wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Pilze zu markieren, so dass sie im Weizengewebe eindeutig zu identifizieren sein sollten.

Die Zellwände von Pilzen und Pflanzen besitzen chemisch sehr unterschiedliche Strukturen. Während die Pilzzellwände als Hauptkomponente Chitin aufweisen, ist das strukturgebende Polymer bei den Pflanzen die Zellulose. Trotzdem stellen beide ausgesprochen wirksame Barrieren gegen die Anlagerung von Antikörpern oder anderen chemischen Stoffen dar und erschweren somit erheblich die Untersuchung intrazellulärer Veränderungen, die sich durch Wirt-Pathogen-Interaktionen ergeben könnten (Czymmek et al., 1996). Denn die Protokolle, die für eine Anwendung an Pilzzellen geeignet sind, sind dies wiederum nicht, um an Pflanzenzellen eingesetzt werden zu können (Skalamera und Heath 1998). Die unterschiedlichsten Methoden wie das Färben der Pilze mit Farbstoffen und Fluoreszenzfarbstoffen oder das Entfärben des chlorophyllhaltigen Pflanzenmaterials mit Chloralhydrat, um das Pathogen besser lokalisieren zu können, finden hierbei Anwendung. Ergänzt werden diese Verfahren durch die Markierung pilzlicher Zellwandkomponenten mit Lektinen, Enzymen oder Antikörpern (Jackson und Heale 1987).

Eine für diesen Zweck besonders gut geeignete Methode ist die Transformation mit Genen für fluoreszierende Reporterproteine, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Um Pilze zu transformieren existieren unterschiedliche Vorgehensweisen, die auf der vorhergegangenen erfolgreichen Etablierung der jeweiligen Methode in anderen Arten basieren. Der erste Bericht über die Transformation von Pilzzellen stammt aus dem Jahr 1973,

wobei sich diese ersten Versuche noch durch mangelnde Reproduzierbarkeit und geringe Stabilität des Transformationsereignisses auszeichneten (Mishra und Tatum 1973; Fincham 1989). Mittlerweile wurden alle Hauptgruppen von Pilzen, einschließlich einer Reihe von Vertretern der Zygomyceten, Ascomyceten, Basidiomyceten und Fungi imperfecti, transformiert (Ruiz-Diez 2002).

Auf der einen Seite der verschiedenen Vorgehensweisen steht die Protoplastierung, auf der anderen Seite sind hingegen die Techniken zu finden, die einen enzymatischen Verdau der Zellwände umgehen. Da sich die Herangehensweise über die Protoplastierung bewährt hat und sich die fünf in dieser Arbeit verwendeten *Fusarium*-Arten, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* und *F. tricinctum*, im Gegensatz zu den meisten biotrophen Pilzen, sehr gut *in vitro* sowohl auf festen Medien als auch in Flüssigkultur kultivieren lassen, wurden die Transformationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, an zuvor protoplastierten Zellen durchgeführt. Die Protoplastierung ist nach wie vor eine der gebräuchlichsten Methoden für die Transformationsvorbereitung und besitzt gegenüber der Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* Vorteile (Hynes 1996; Ruiz-Diez 2002). Letztere beruht grundsätzlich auf einer Wirt-Parasit-Interaktion zwischen Bakterium und Wirtspflanze, die, wenn sie nicht gegeben ist, unter Umständen einer erfolgreichen Transformation im Wege stehen kann. Auch unter Pflanzen hat *Agrobacterium tumefaciens* ein begrenztes Wirtsspektrum. Transformationen sind hier bei einigen Dikotylen durchführbar, bei anderen und den meisten monokotylen Pflanzen ist dies allerdings nicht der Fall (Finer et al., 1999).

Für die Bildung der Protoplasten wurde circa zwölf Stunden altes Myzel verwendet. Protoplasten, die aus solch jungen Pilzhyphen gewonnen wurden, können nach dem enzymatischen Zellwandabbau leicht von den übriggebliebenen Hyphen getrennt werden. Nach der Protoplastierung erfolgte die Transformation der fünf oben genannten *Fusarium*-Arten mit den Plasmiden pSM1, pPgpd-DsRed und pUCW18 und einer Kombination aus Calciumchlorid und Polyethylenglycol (PEG) (Mikkelsen et al., 2003; Pöggeler et al., 2003). Dieses Transformationssystem beruht auf der Resistenz der transformierten Zellen gegen das Aminocyclitol-Antibiotikum Hygromycin B und ist mittlerweile für zahlreiche filamentöse Pilze wie *Cephalosporium acremonium* (Samson et al., 1985), *Aspergillus nidulans* und *A. niger* (Ward et al., 1986; Punt et al., 1987), *Penicillium roqueforti* (Durand et al., 1991), *Neurospora* (Orbach et al., 1986; Vollmer und Yanofsky 1986) und einige Pflanzenpathogene beschrieben (Oliver et al., 1987; Kistler und Benny 1988; Huang et al., 1989). Vermittelt wurde die Resistenz durch die Plasmide pSM1 und pUCW18, die das Gen für die

Hygromycin B-Phosphotransferase aus *Escherichia coli* unter der Kontrolle von Transkriptionskontrollelementen aus *A. nidulans* enthielten (Pöggeler et al., 2003).

Die Transformationseffizienz war mit 5-50 EGFP-Transformanten/ μ g DNA und mit 1- 30 DsRed-Transformanten/ μ g DNA nach der Cotransformation von *F. avenaceum* und *F. graminearum* deutlich höher als bei anderen Transformationsereignissen, wo 1-5 Transformanten/ μ g DNA erzielt wurden (Kistler und Benny 1988; Lagopodi et al., 2002). Da das heterologe Plasmid pSM1 sowohl den Selektionsmarker, also auch das die Hygromycin B-Resistenz vermittelnde Gen, als auch das egfp-Gen enthielt, hätte man erwarten können, dass alle hygromycinresistenten Kolonien unter dem Mikroskop auch Fluoreszenz aufwiesen. Die Tatsache, dass dies nicht der Fall war, kann damit begründet werden, dass eine fehlerhafte, unvollständige Integration des Plasmids in das jeweilige Pilz-Genom stattgefunden hatte. Bei dieser wurde zwar das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin übertragen, allerdings nicht das Gen für das Reporterprotein EGFP. Um die Pilze mit DsRed zu markieren, wurde hingegen eine Cotransformation mit den zwei Plasmiden pPgpd-DsRed und pUCW18 durchgeführt. Während ersteres das Gen für das rotfluoreszierende Protein codiert, wurde durch pUCW18 die Resistenz gegen den Selektionsmarker Hygromycin B vermittelt. Bei dieser Vorgehensweise ist mit antibiotikumresistenten Kolonien, die aber nicht das Reportergen DsRed exprimieren, zu rechnen, da in einigen Fällen nur eines der beiden Plasmide im Zuge der Transformation integriert wurde oder auch hier, wie im oben genannten Fall fehlerhafte oder unvollständige Integrationen stattgefunden haben könnten.

Sowohl der konstitutive gpd-Promotor aus *A. nidulans*, der in den Plasmiden pSM1 und pPgpd-DsRed die Expression der Gene EGFP und DsRed steuert, als auch die exprimierten, fluoreszierenden Reporterproteine funktionierten hocheffizient. Im Cytoplasma von Konidien und Hyphen aller fünf *Fusarium*-Arten war eine starke Expression der beiden Gene festzustellen wie auch für andere Fälle bereits beschrieben (Lorang et al., 2001). Allerdings lag keine gleichmäßige Verteilung der Proteine im Cytoplasma vor, da diese keine Transportsignale besaßen. Ein großer Teil der Proteine einer Zelle wird im Cytosol synthetisiert. Daher muss diese die Sortierung und den Transport der Proteine zu deren Zielort durch bestimmte Mechanismen gewährleisten. Im Allgemeinen werden Proteine, die für den Transport in ein bestimmtes Organell vorgesehen sind, als Vorläuferform gebildet, die mit einem entsprechenden Transportsignal ausgestattet ist. Aufgrund dieses Signals gelangt das Protein zu seinem Bestimmungsort (Schatz und Dobberstein 1996). Besonders die Aufnahmen der zweifarbigen Hyphen illustrieren, dass die Proteine mit unterschiedlichen

Organellen oder zellulären Strukturen assoziiert sind und daher kein Signal vorhanden sein kann, das die Proteine für ein bestimmtes Organell markiert. Die Transformation und Integration der Plasmid-DNA in das Pilzgenom blieb auch über einen längeren Zeitraum der Kultivierung der Pilze auf festen Medien *in vitro* als auch im weiteren Verlauf nach Inokulation auf Weizenpflanzen *in vivo* mitotisch stabil. Mehrfach wurde dieser Umstand der mitotischen Stabilität zuvor schon generell für Transformanten filamentöser Pilze beschrieben (Yelton et al., 1984; Oliver et al., 1987; Finkelstein 1992; Nara et al., 1993; Thrane et al., 1995). Erst nach mehreren Wochen begann die Intensität der Fluoreszenz abzunehmen und dann vollständig zu verschwinden.

Um die Art und Weise der Integration zu untersuchen und die Anzahl der integrierten Kopien zu bestimmen, wurden mit der genomischen DNA von jeweils drei zufällig ausgewählten EGFP- und drei DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum* Southern Blot-Analysen durchgeführt. In allen EGFP-Transformanten der beiden *Fusarium*-Arten konnte das erwartete Fragment von 1800 bp nachgewiesen werden. Allerdings war nur in FGREGFP2 und 3 eine einfache Integration einer Kopie des Reportergens erfolgt, wie dies bei einer durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation in den aller meisten Fällen zu beobachten ist (de Groot et al., 1998; Abuodeh et al., 2000; Covert 2001). Die Analyse der DsRed-Transformanten zeigte mit einer Ausnahme in allen Fällen das erwartete Ergebnis. Bei den anderen EGFP-Transformanten außer den beiden oben genannten waren Banden zu sehen, die sowohl kleiner als auch größer als die gewünschte Bande waren. Das kleinere Fragment in FAVEGFP2 entstand durch die Hybridisierung der Sonde mit einem entsprechenden, allerdings teilweise deletierten Genabschnitt. Die größeren Banden wurden durch unterschiedliche Integrationsvarianten hervorgerufen. Da im Genom der *Fusarium*-Arten keine Sequenzen existieren, die zur der Basenabfolge der drei Plasmide homolog sind, erfolgt die Integration der Plasmide in das Pilz-Genom zufällig durch heterologe Rekombination. Beim Einbau einer einzelnen Kopie findet durch Crossover zwischen dem Plasmid und nichthomologen Abschnitten auf einem Chromosom der Pilze ein Austausch von DNA statt. Des Weiteren kann es zur Integration von mehreren Kopien in Tandemorientierung kommen. Dies wird zum einen durch homologe Rekombination zwischen zirkulären Plasmiden hervorgerufen und hat dann zirkuläre Oligomere zur Folge. Diese wiederum werden durch erneute homologe Rekombination, diesmal allerdings mit einer bereits in das Pilzgenom integrierten Einzelkopie, ihrerseits in die genomische DNA eingebaut und ergeben dann in der Southern Blot-Analyse wesentlich größere Fragmente als jenes, das nach Einbau einer Einzelkopie zu erwarten wäre. Zum

anderen kann es nach der primären Integration eines monomeren Plasmids zu einer sekundären Integration einer weiteren Plasmid-Kopie kommen. Diese erfolgt abermals durch homologe Rekombination und könnte als Erklärung für die Fragmente hinzugezogen werden, die zwischen den größten Banden und der eigentlich erwarteten Bande liegen. Zudem wäre in diesem Fall allerdings auch eine Wiederholung des geschilderten Vorgangs denkbar, was dann wiederum sehr große DNA-Fragmente zur Folge hätte. Als letzte Variante käme die Möglichkeit eines unvollständigen Verdaus mit den Restriktionsenzymen in Betracht, so dass das in die genomische DNA integrierte Plasmid nicht ausgeschnitten worden wäre, sondern dass das entsprechende Restriktionsenzym erst an einer weiter entfernt gelegenen Schnittstelle die DNA-Stränge getrennt hätte.

Fitness der Transformanten von *Fusarium* spp. im Vergleich zum Wildtyp

Der Gebrauch von spezifischen Reporterproteinen wie EGFP und DsRed stellt eine sehr elegante und unkomplizierte Methode dar, die unterschiedlichsten Prozesse in lebenden Organismen in deren natürlicher Umgebung zu untersuchen. Die Visualisierung von Pathogenen durch die Markierung mit solchen fluoreszierenden Proteinen gewährt Einblicke in Vorgänge wie z. B. Wachstum und Entwicklung innerhalb der Wirtspflanzen und Expressionsmuster bestimmter Gene, ohne dass eine Beeinträchtigung von Wachstum oder Pathogenität der Pilze erkennbar wäre. Die Anwendung dieser Reporterproteine ermöglicht ein einfaches, visuelles Screening der entstandenen Transformanten und dient in weiterführenden Untersuchungen durch Lorang et al. (2001) als diagnostisches Werkzeug für die An- oder Abwesenheit von Pilzen in Pflanzen, wobei für die Aktivität dieser Proteine außer Sauerstoff keine weiteren exogenen Substrate oder Cofaktoren von Nöten sind. Bevor sich die Markierung der Pilze mit den fluoreszierenden Proteinen aber für Untersuchungen *in situ* zunutze gemacht werden konnte, musste sichergestellt werden, dass Vitalität und Pathogenität der Transformanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp durch den Gentransfer keine Veränderung oder Beeinträchtigung erfahren hatten. Aus diesem Grund wurden zunächst mit den jeweils drei EGFP- und drei DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum*, die auch schon für die Southern Blot-Analyse ausgewählt worden waren, Myzelwachstumstests auf künstlichen Nährmedien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Tests belegen, dass durch die Integration der Plasmid-DNA in die Genome der beiden *Fusarium*-Arten keine für das Wachstum *in vitro* essentiellen Gene deletiert wurden und, dass die Expression der Reportergene EGFP und DsRed im Cytoplasma der Pilze keine das Wachstum erheblich behindernden Effekte verursachte. Generell muss bei der Beurteilung der Vitalität

der Wildtypen und Klone in Form dieser Wachstumstests allerdings bedacht werden, dass es sich bei der Nährstoffquelle um ein standardisiertes, künstliches Nährmedium handelt, was bedeutet, dass der Nährstoffgehalt bekannt ist. Im Vergleich des Wachstums der Wildtypen der beiden *Fusarium*-Arten auf dem Voll- und dem Minimalmedium fiel zunächst auf, dass *F. avenaceum* auf beiden Medien etwa gleich gut gedieh, und der Nährstoffmangel im Minimalmedium keinen negativen Einfluss auf das Myzelwachstum ausübte. *F. graminearum* zeigte ein, zwar noch stärkeres als *F. avenaceum*, aber im Vergleich mit dem Wachstum auf PDA ein um mehr als die Hälfte verringertes Wachstum auf SNA. Zunächst bietet dieser stärkere Zuwachs an Biomasse von *F. graminearum*, der auch in der Literatur von Brennan et al. (2003) zuvor schon für diese Art beschrieben wurde, natürlich einen Vorteil bei der Invasion der Wirtspflanze, da er durch die größere besiedelte Fläche und das Eindringen des Myzels somit einen erhöhten „Zugriff“ auf die Nährstoffe in der Pflanze besitzt. Sowohl in der Wirtspflanze, vor allem aber auch bei Kultivierung auf festen Nährmedien, kann ein stärkeres Flächenwachstum aber auch einen schnelleren Verbrauch der im Medium vorhandenen Nährstoffe bedeuten und damit andererseits auch wiederum einen limitierenden Faktor darstellen.

Bei Wachstum der Transformanten beider Arten unter Optimalbedingungen zeigte sich, dass der Eingriff in das Genom der Pilze durch die Transformation bei *F. graminearum*, vergleichsweise stärkere Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten besitzt als dies bei *F. avenaceum* der Fall ist. Selbstverständlich muss an dieser Stelle beachtet werden, dass solche Effekte auch durch die natürliche Streuung in Bezug auf Vitalitätsparameter sowohl bei Transformanten als auch bei den Wildtypen auftreten können. Denn obwohl das für die Transformationen eingesetzte Ausgangsmaterial Myzel aus Kulturen von Einzelsporisolationen stammte, bedeutet der Vorgang der Transformation durch die zufällige Integration der Reportergene in das pilzliche Genom eine Veränderung der genetischen Information der Pilze, die in keinem der entstandenen Transformanten gleich ist. Beim Vergleich der Transformanten beider *Fusarium*-Arten sind negativere Auswirkungen durch die Transformation mit dem dsRed-Reportergen zu verzeichnen. Die Ursache hierfür könnte darin begründet sein, dass dieser Transformationsvorgang eine Cotransformation war, was bedeutet, dass zwei Plasmide in das Pilzgenom integriert werden. Dies kann durch eventuelle Gendeletionen stärkere Veränderungen in der Vitalität hervorrufen, als wenn nur an einer Stelle in das Genom eingegriffen worden wäre. Bezogen auf die Maximalwerte der Koloniegröße sind die Unterschiede zwischen den EGFP- und den DsRed-Transformanten von *F. graminearum* bei Kultivierung auf dem Minimalmedium allerdings geringer als auf

dem Vollmedium. Wahrscheinlich überlagert der Nährstoffmangel die negativen Effekte, die der Transformationsvorgang auf das Wachstum des Pilzes haben könnte. Generell entwickelten sich die Transformanten von *F. avenaceum* unter Nährstoffmangel auf SNA besser als die von *F. graminearum*, aber auch in diesem Fall treten die negativen Effekte durch die Transformation deutlicher hervor. Um trotz des Nährstoffmangels im Medium wachsen zu können, müsste der Metabolismus an sich nun optimal laufen, aber eventuell beeinträchtigt der Eingriff in das Genom des Organismus bedingt durch den Gentransfer vielleicht die Fähigkeit, trotz eines geringen Nährstoffangebots wie der Wildtyp das Nährmedium zu kolonisieren.

Im Zuge dieser Myzelwachstumstests wurden Konfrontationsassays mit ausgewählten EGFP- und DsRed-Transformanten der beiden *Fusarium*-Arten auf Minimalmedium (SNA) durchgeführt. Hierfür wurden mit Myzel bewachsene Animpfstücke zweier unterschiedlich markierter Klone der gleichen *Fusarium*-Art auf einer Agarplatte kultiviert. Makroskopisch waren keinerlei wachstumshemmende Effekte zu beobachten. Bei der mikroskopischen Untersuchung von Proben aus der Übergangszone, also dem Bereich, wo beide Kolonien aufeinander stießen, wurden Hyphen gefunden, die offensichtlich sowohl das grün- als auch das rotfluoreszierende Protein enthielten. Das Auftreten dieser zweifarbigen Hyphen kann mit der Bildung von Anastomosen erklärt werden. Pilzhypen zweier kompatibler Isolate besitzen die Fähigkeit, über Plasmabrücken, sogenannten Anastomosen, miteinander zu verschmelzen und ein sogenanntes Heterokaryon zu bilden. Der Begriff Heterokaryon bezeichnet eine Zelle, in deren Cytoplasma mehrere Kerne vorhanden sind, die allerdings genetisch unterschiedlich sind. Ein Teil dieser Kerne entstammt der jeweils anderen Hyphe. Dieser Vorgang bietet unter anderen homothallischen Pilzen, zu denen die Gattung *Fusarium* gehört, die Möglichkeit der genetischen Rekombination auch außerhalb des sexuellen Entwicklungszyklus (Adams et al., 1987). In zahlreichen zum Teil fast hundert Jahre alten Studien wurde dieser Vorgang behandelt, wobei häufig die Rekombination zwischen verschiedenen auxotrophen Mutanten, die bestimmte essentielle Substanzen nicht selbstständig synthetisieren können, als Beweis für die Bildung von heterokaryotischen Zellen in Folge von Kernmigrationen über Anastomosenbrücken angeführt wurde (Messias und Azevedo 1980). Nach gemeinsamer Kultivierung der beiden Mutanten auf Minimalmedium wurde der Defekt aufgrund des Austauschs von genetischem Material über Plasmabrücken kompensiert. Dieser Vorgang liefert eine plausible Erklärung für das Auftreten der zweifarbigen *Fusarium*-Hyphen. Über Anastomosen, die auch photographisch dokumentiert werden konnten, gelangt die im Zellkern lokalisierte genetische Information für das eine Reporterprotein in eine der

Hyphen, die das Gen für das andere fluoreszierende Protein exprimierten. Im weiteren Verlauf wurde dieses erste Gen ebenfalls translatiert. Eine weitere Erklärung stellt der Transfer des schon exprimierten Reporterproteins durch die Anastomosenbrücke in die andersfarbige Hyphe dar. Gefördert wurde die Bildung der Anastomosen durch die Kultivierung der Mikroorganismen auf nährstoffarmem Medium. Der Stress, der durch den Nährstoffmangel ausgelöst wird, bringt die Pilze dazu, über eine gesteigerte Anzahl an Plasmabrücken ihre genetische Information an andere kompatible Isolate weiterzugeben. Hierbei muss allerdings auch wieder berücksichtigt werden, dass es sich hier um Beobachtungen *in vitro* unter standardisierten Bedingungen handelt. Die Nährstoffzusammensetzung ist hier im Gegensatz zur lebenden Wirtspflanze genau bekannt. Die Bildung von Anastomosen liefert einen weiteren Beweis des wildtypähnlichen Verhaltens der Transformanten, da die Bildung von Plasmabrücken zwischen den Hyphen einer *Fusarium*-Art als charakteristisch beschrieben wurde (Mesterhazy 1973).

Ein weiterer Faktor, der Aussagen über die Vitalität von Pilzen ermöglicht, ist das Ausmaß der Sporulation, hier der Bildung von Makrokonidien. Die Sporulation von *Fusarium*-Arten ist stark von den Kulturbedingungen abhängig und nimmt deutlich zu, sobald der Pilz Stress wie zum Beispiel Nährstoffmangel ausgesetzt ist (Fisher et al., 1982; Moradi 2008). Im Prinzip wurde dies auch durch die Ergebnisse der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Sporulationstests bestätigt. Bis auf die DsRed-Transformanten von *F. avenaceum*, hier könnte vielleicht stärkerer Nährstoffmangel auch schon eine Hemmung der Biosynthese von Makrokonidien auslösen, zeigten die Transformanten, die ein höheres Myzelwachstum aufwiesen, eine tendenziell geringere Sporulationsfähigkeit. Bei den Wachstumstests von DsRed-Transformanten von *F. graminearum* auf SNA erwies sich FGRDsRed3 als der Transformant mit den geringsten Koloniegrößen, die Bildung von Makrokonidien, die hier als Stressmarker interpretiert werden soll, war bei diesem Klon jedoch am höchsten. Die Ergebnisse beider Tests mit den EGFP-Transformanten von *F. graminearum* spiegeln diese Beobachtung bedingt ebenfalls wieder, hier muss allerdings beachtet werden, dass der negative, und vermutlich zusätzlich Stress auslösende, Effekt bedingt durch die Transformation in diesen Fällen wie oben schon erwähnt hier nicht so sehr ins Gewicht fällt. Andererseits könnte hier auch der Nährstoffmangel das größere Problem darstellen. Im Falle des Transformanten von *F. avenaceum*, der nicht mehr in der Lage war, Makrokonidien zu bilden, wurde vermutlich durch die Insertintegration ein für die Sporulation essentielles Gen deletiert.

Da die Resultate, die im Zuge dieser Myzelwachstums- und Sporulationstests erzielt wurden, nicht auf das System Pflanze übertragen werden können, da in diesem Fall die genaue Nährstoffzusammensetzung nicht bekannt ist, wurden Pathogenitätstests an den Blättern der Wirtspflanze Weizen durchgeführt. Über einen Zeitraum von dreizehn Tagen hinweg wurde die Entwicklung je eines EGFP- und eines DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum* an mit hoher Konidienkonzentration punktinokulierten Blättern anhand eines Index für die Symptomausprägung dokumentiert. Bei beiden *Fusarium*-Arten ergab sich eine deutliche zeitliche Verzögerung des makroskopisch sichtbaren Infektionsbeginns durch die DsRed-Transformanten. Bei *F. avenaceum* waren erst nach einer Latenzphase von vier Tagen Symptome zu erkennen, die Infektion durch den Klon von *F. graminearum* wurde zwar zu einem früheren Zeitpunkt sichtbar, verlief aber im Verlaufe der ersten vier Tage deutlich schwächer im Vergleich zu dem EGFP-Transformanten und dem Wildtyp. Ein großer Teil der Literatur, die sich mit der Infektion von Weizen durch Vertreter der Gattung *Fusarium* beschäftigt, schildert die Infektion von Ähren (Kang 2000b; Miller et al., 2004; Jansen 2005). Hierauf wird im späteren Verlauf der Diskussion auch noch eingegangen. Einige Faktoren, die bei dem Befall von Ähren eine Rolle spielen, haben aber sicherlich ebenfalls Einfluss auf die Infektion der Blätter. Bis zum Jahr 2011 wurde weder für *F. avenaceum* noch *F. graminearum* die Ausbildung von Appressorien beschrieben, durch die die Penetration des Wirtsgewebes erfolgt (Mendgen et al., 1996; Cuomo et al., 2007; Kikot et al., 2009). *F. avenaceum* bildet sogenannte Penetrationshyphen, mit deren Hilfe er etwa drei Tage nach Infektion in das Gewebe eindringt (Kang et al., 2005). Aber auch zu diesem Zeitpunkt werden die Epidermiszellen meist noch nicht oder noch gar nicht durchwachsen, sondern der Pilz kolonisiert zunächst nur die Kutikula. Es kommt auch vor, dass der Ascomycet nur nahe der Kutikula oder zwischen Zellwandschichten wächst, um sich zunächst im Wirtsgewebe zu etablieren. *F. graminearum* hingegen bildet nach der Keimung zunächst keinerlei Penetrationsstrukturen aus und entwickelt sich zunächst asymptomatisch auf dem äußeren Ährchengewebe (Seong et al., 2008) (Boenisch und Schäfer 2011). Im Folgenden kolonisiert der Pilz nach Bushnell et al. (2003) das Weizengewebe vor allem durch die Spaltöffnungen sowohl subkutikulär als auch interzellulär. Nach neuesten Erkenntnissen bildet *F. graminearum* jedoch mit fortschreitender Infektion Appressorien aus, mit denen er in das Gewebe der Wirtspflanze eindringt (Boenisch und Schäfer 2011). Nach erfolgreicher Penetration des Wirtsgewebes bilden beide *Fusarium*-Arten während des interzellulären Wachstums extrazelluläre Enzyme wie Zellulasen, Pektinasen und Xylanasen (Wanjiru et al., 2002; Kang et al., 2005). Die Hyphen induzieren somit degenerative Veränderungen in der

Wirtszelle und initiieren die nekrotrophe Phase der Pilzinfektion (Kang et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Infektionsfähigkeit der beiden DsRed-Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum* wäre demnach erstens, dass durch die Integration der Fremd-DNA in beiden Fällen Gene, die die Bildung eines oder mehrerer dieser extrazellulären Enzyme codieren, deletiert wurden und die Kompensation dieses Ausfalls mehr Zeit in Anspruch nimmt. Zusätzlich könnte sich eine solche Gendeletion auch in einem für die Konidienkeimung essentiellen Gen ereignet haben, sodass die Expressionsmuster dieser hunderten von Genen gestört wurden (Seong et al., 2008). In jedem Fall muss es sich hier um eine Pathogen-Wirt-Interaktion während der primären Invasion der Pflanze durch den Pilz handeln, da das Wachstum der Transformanten auf dem Nährmedium gegenüber dem Wildtyp nicht eingeschränkt war.

Entwicklung und Mykotoxin-Synthese von *Fusarium* spp. an Weizen und diese beeinflussende Faktoren

Um genauere Aussagen über die Befallsentwicklung an Weizenpflanzen machen zu können, wurde in weiterführenden Experimenten das Wachstum der Pilze mit Hilfe der TaqMan[®] Real-time PCR quantitativ erfasst. Mittels Sprühinokulation sollten die Blätter mit Konidien suspensionen der beiden Wildtypen, des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* und des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* infiziert werden. Es war jedoch nicht möglich, innerhalb des Versuchszeitraums von sieben Tagen eine Infektion zu etablieren und die Entwicklung der Pilze an den Blättern zu verfolgen, was zunächst technische Gründe haben könnte. Die Methode der Sprühinokulation ist zwar arbeitssparend, aber es ist nicht möglich, die Menge der aufgetragenen Konidien wirklich nachzuvollziehen, und die Konidienkonzentration ist möglicherweise zu gering, um eine aussagekräftige Quantifizierung der Pilz-DNA im Blattmaterial durchführen zu können. Das Scheitern einer Infektionsetablierung könnte aber auch biologische Gründe haben. Obwohl Weizen in jedem Wachstumsstadium und an jedem Teil der Pflanze mit *Fusarium*-Konidien infiziert werden kann (Xi und Turkington T. K. 2003; Guenther und Trail 2005; Mudge et al., 2006), ist die Weizenblüte jedoch das anfälligste Stadium (Schröder und Christensen J. J. 1963; Sutton 1982; Brown et al., 2010). Eine systemische Infektion der Ähre durch den Befall von Blättern und Halmen wird ausgeschlossen (Fehrmann und Duben J. 1980; Snijders 1990). Daher könnte es sein, dass die Konidien zwar auf den Blättern auskeimen, aber nicht ohne äußere Verletzungen des Blattgewebes eindringen können. Zusätzlich antworten Pflanzenzellen auf die Infektion durch Pilze nach der Erkennung von deren Zellwandkomponenten mit der

Aktivierung eines Prozesses, der als Systemisch Aktivierte Resistenz (SAR) bezeichnet wird (Albersheim und Anderson-Prouty 1975; Ride 1992; Boller 1995). Im Pflanzengewebe ist eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen wie extrazellulären Chitinasen (Collinge et al., 1993), Chitosanasen (Grenier 1990) und Glucanasen (Mauch et al., 1988) an der Zersetzung der pilzlichen Zellwandpolysaccharide beteiligt. Dies hat zum Einen eine Schwächung der Zellwände zur Folge, zum Anderen können aber auch die löslichen und diffusionsfähigen Fragmente, die durch die enzymatische Zersetzung entstehen, im Pflanzengewebe als Indikator für die Anwesenheit eines potentiellen Pathogens dienen (Ham 1991; Ryan und Farmer 1991). Sowohl Chitin als auch Chitosan (Pearce 1982; Moerschbacher et al., 1986; Gotthardt und Grambow H. J. 1992) und Oligomere aus N-Acetylglucosamin (Barber et al., 1989; Gotthardt und Grambow H. J. 1992) wurden als Botenstoffe (Elizitoren) für die abwehrbezogene Lignifizierung in Gewebe von Weizenblättern identifiziert (Pearce 1982; Moerschbacher et al., 1986; Barber et al., 1989). Es wird angenommen, dass das für N-Acetylglucosamin spezifische Lektin Weizenkeimagglutinin (WGA) an der Erkennung von Chitin-Oligomeren beteiligt ist (Ride et al., 1989). Da gerade diese Oligomere durch die enzymatische Zersetzung der Pilzzellwände durch pflanzliche Hydrolasen entstehen, könnte es sein, dass die Infektion durch die *Fusarium*-Arten schon in einem frühen Stadium der Entwicklung erkannt wird und Mechanismen in Gang gesetzt werden, die eine Besiedlung der Weizenblätter verhindern. Durch die Bindung von WGA an die Zellwände der Pilze kommt es zu drastischen, morphologischen Veränderungen, die im weiteren Verlauf Auswirkungen auf die Entwicklung der Keimschläuche der *Fusarium*-Arten haben (Ciopraga et al., 1999).

An dieser Stelle muss noch erwähnt werden, dass die für diesen Versuch verwendeten Pflanzen bis zu Versuchsbeginn im Gewächshaus kultiviert worden waren. Die für die Pathogenitätstests eingesetzten Weizenpflanzen standen allerdings von der Aussaat an kontinuierlich in der Klimakammer. Im Nachhinein wurde festgestellt, dass diese aufgrund im Vergleich mit Gewächsbedingungen schlechteren Bedingungen in der Klimakammer eine geringere Vitalität aufwiesen und besser infiziert werden konnten.

Die Hauptproblematik, die sich allerdings durch das Auftreten von Vertretern der Gattung *Fusarium* ergibt, ist die Tatsache, dass sie durch die Infektion der Weizenähren und die daraufhin folgende Abgabe von Mykotoxinen in das Erntegut erhebliche Schäden anrichten. Diese Pilze kommen niemals isoliert in ihrer Wirtspflanze vor, sondern stehen in ständiger Interaktion bzw. Konkurrenz mit anderen *Fusarium*-Arten. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden Weizenähren mit Hilfe einer Kanüle inokuliert. Im Gegensatz zur Sprühinokulation ist die Infektion der Ähren auf diese Weise gezielter und genauer. Nach der

Inokulation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und das Wachstum des EGFP-Transformanten von *F. avenaceum*, des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* und der Kombination aus beiden Klonen mittels Real-time PCR quantitativ bestimmt. Sieben Tage nach Inokulation wies FGRDsRed im Einzelversuch eine etwa zehnfach höhere Biomasse und damit ein deutlich schnelleres Wachstum auf als FAVEGFP, eine Beobachtung, die auch schon bei den Myzelwachstumstest *in vitro* gemacht worden war und zudem auch in der Literatur beschrieben wurde. Hier wird *F. avenaceum* eine grundsätzlich geringere Pathogenität als *F. graminearum* zugeschrieben, was sich auch in der niedrigeren Bildung von Biomasse durch den Pilz äußern kann (Mihuta-Grimm 1989; Kang et al., 2005). In den Ähren, die mit der Kombination aus beiden *Fusarium*-Arten infiziert worden war, ist bei Betrachtung der Entwicklung von FGRDsRed eine deutliche Beeinträchtigung durch die Anwesenheit von *F. avenaceum* zu beobachten, da der DNA-Gehalt sieben Tage nach Inokulation um 88% niedriger ist als im Einzelversuch, was nicht nur auf den Umstand zurückgeführt werden kann, dass hier nur mit der Hälfte an Konidien inokuliert wurde. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu Aussagen aus früheren Arbeiten, in denen keine Abnahme der Biomasse von *F. graminearum* in Koinokulation außer im Falle von *F. culmorum* ermittelt werden konnte (Moradi 2008). Vierzehn Tage nach Inokulation hatte sich der DNA-Gehalt von FAVEGFP in der Einzelvariante verdoppelt, der von FGRDsRed hingegen verzehnfacht. Der DNA-Gehalt von FAVEGFP im Kombinationsansatz hatte sich hingegen trotz um die Hälfte geringerer Konidienzahl verdoppelt und wurde demnach also in keinster Weise von der Anwesenheit von *F. graminearum* beeinträchtigt, sondern erhielt eher einen Vorteil daraus. Der DNA-Gehalt des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* in dieser Variante hingegen war zwar um circa 86% angestiegen, betrug aber nur noch circa 8% des Gehaltes, der nach der Einzelinokulation ermittelt worden war. Dieser Wert lag bei dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* hingegen nur um 45% niedriger, was aufgrund der geringeren Konidienzahl bei der Inokulation in etwa zu erwarten war.

Ein völlig anderes Bild ergab sich jedoch einundzwanzig Tage nach Inokulation. Zu diesem Zeitpunkt wurde in der Einzelvariante mit FAVEGFP zum ersten Mal ein deutlich geringerer DNA-Gehalt ermittelt als in der Kombination mit dem Transformanten von *F. graminearum*. Bei diesem hatte sich die Entwicklung, die zuvor schon beobachtet worden war, fortgesetzt, wobei der DNA-Gehalt von *F. graminearum* in der Kombination nur 38% des Gehaltes, der in der Einzelvariante detektiert wurde, betrug. Der Gehalt an DNA für FAVEGFP in der Kombination lag um 31% höher als in der Einzelvariante. Auch hier liegt ein Widerspruch zu älteren Studien vor, in denen ein geringerer DNA-Gehalt von *F.*

avenaceum in Kombination mit *F. graminearum* im Vergleich zur Einzelvariante beschrieben wurde (Moradi 2008).

Die Besiedlung einer Pflanze ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Reihe von Faktoren, den sogenannten Pathogenitätsfaktoren beteiligt ist. Hierzu gehört unter anderem die Sekretion von hydrolytischen Enzymen durch die Pilze, die sowohl dem Abbau der pflanzlichen Zellwände und der Kutikula und damit auch der Versorgung mit Nährstoffen dienen. Beide *Fusarium*-Arten bilden ein Spektrum von zellwandabbauenden Enzymen wie Kutinasen, Cellulasen, Pektinasen, Xylanasen, um die Penetration der Zellen und die Ausbreitung im pflanzlichen Gewebe zu ermöglichen (Mullen 1971; Soliday und Kolattukudy 1976; Mańka 1988; Kang et al., 2005). In Studien wurde im direkten Umfeld von interzellulären Pilzhyphen von *F. avenaceum* ein verringerter Gehalt an Zellulose, Pektin und Xylan festgestellt (Kang et al., 2005). Aus diesen Makromolekülen setzen sich die Primärzellwand, die Sekundärwand, die Matrix und die Mittellamelle, also die Substanz zwischen den einzelnen Pflanzenzellen, zusammen. Die abaxialen Oberflächen der Epidermiszellen der das Korn umschließenden Spelzen und die darunterliegenden Hypodermiszellen weisen eine starke Lignifizierung und damit einhergehend eine Verdickung der Zellwände auf (Pugh et al., 1933). Dies macht das Eindringen in das Ährchen für beide *Fusarium*-Arten zunächst unmöglich. Im Gegensatz dazu sind die nach innen gerichteten Zellwände von Lemma und Palea deutlich dünner, und die Pilze können nun nach oberflächlichem Myzelwachstum in Richtung der empfindlicheren Teile des Ährchens in die Pflanzenzellen eindringen. Im weiteren Verlaufe ist das sich entwickelnde Myzel von einer Anzahl abgestorbener Pflanzenzellen umgeben, weshalb *Fusarium*-Arten als perithotroph bezeichnet werden. Vor der Besiedlung des pflanzlichen Gewebes werden dessen Zellen abgetötet, und diese Erreger sind somit in die Gruppe der toxigenen bzw. pathogenen Saprophyten einzuordnen (Gäumann 1946). Im Zusammenhang mit dem Infektionsvorgang ist nun das oben schon erwähnte breite Spektrum an Enzymen von großer Bedeutung, das die Spitze der wachsenden Hyphe umgibt und den hydrolytischen Abbau von Mittellamelle und Zellwänden katalysiert (Gäumann 1946; Kang 2000b; Wanjiru et al., 2002). Im Vergleich mit anderen Pilzen wie *Magnaporthe grisea* werden die Gene, die die Pektinasen für die Zersetzung der pektinreiche Mittellamelle codieren, in *F. graminearum* überexprimiert (Cuomo et al., 2007). Zusätzlich zu den schon erwähnten Enzymen spielen auch Lipasen eine Rolle bei der Zersetzung der Kutikula. Dies wurde durch die reduzierte lipolytische, extrazelluläre Aktivität bewiesen, die bei Untersuchungen mit Knock-out-Mutanten des Lipasegens *FGL1* von *F. graminearum* zu beobachten war (Voigt et al., 2005).

Wie anhand des deutlich höheren DNA-Gehaltes ersichtlich wurde, und es von Brennan et al. (2003) für *F. graminearum* auch beschrieben wurde, wuchs der DsRed-Transformant von *F. graminearum* deutlich schneller als der EGFP-Transformant von *F. avenaceum*. Möglicherweise erreichte er aus diesem Grunde zu einem früheren Zeitpunkt die empfindlicheren Epidermiszellen von Lemma und Palea. Im Folgenden erfolgte durch die Sekretion von hydrolytischen Enzymen durch FGRDsRed der Abbau der pflanzlichen Zellwände. Im Falle von *F. graminearum* wurden durch Phalip et al. (2005) vierundzwanzig unterschiedliche Gruppen von Enzymen identifiziert, die am hydrolytischen Abbau der pflanzlichen Mittellamelle und Zellwände beteiligt sind, und von denen die oben erwähnte große Zahl an Pektinasen dem Pilz womöglich gegenüber *F. avenaceum* bei der Besiedlung einen zeitlichen Vorteil verschafft. FAVEGFP wurde auf diese Art und Weise durch den bereits erfolgten Abbau der Barrieren, die die pflanzlichen Zellwände darstellen, eine wesentlich erleichterte Infektion des Weizens ermöglicht. Die Freisetzung der einzelnen Bestandteile der pflanzlichen Zellwände wie Aminosäuren, Zucker und Fettsäuren liefert dem Transformanten außerdem Nährstoffe. Der erhöhte Konkurrenzdruck, der durch FAVEGFP auf FGRDsRed ausgeübt wurde, wurde anhand der DNA-Gehalt, die in den Teilstücken A (oberhalb des inokulierten Abschnitts) und B (unterhalb des inokulierten Abschnitts) für *F. graminearum* vierzehn bzw. einundzwanzig Tage nach Einzel und Doppelinokulation ermittelt wurden, deutlich. Als alleiniges Pathogen zeigte *F. graminearum* vierzehn Tage nach Inokulation ein basipetales Wachstum wie es auch in der Literatur im Zusammenhang mit dieser *Fusarium*-Art von Skadsen (2004) beschrieben wird und wurde nur in Teilstück B nachgewiesen. Unter dem Konkurrenzdruck durch die Anwesenheit von FAVEGFP aber wurde auch in Teilstück A DNA von FGRDsRed detektiert, was die Vermutung nahelegt, dass dieser in den oberen Teil der Ähre ausweicht.

Es wird diskutiert, dass Mykotoxine aus der Gruppe der Trichothecene (u.a. Deoxynivalenol, Nivalenol), die von *F. graminearum* produziert werden, eine Rolle beim Übergang von der biotrophen in die nekrotrophe Phase spielen, und daher ebenfalls den Pathogenitätsfaktoren zugeordnet werden (Bai et al., 2002; Kang et al., 2005; Maier et al., 2006). Hierbei bedeutet eine erhöhte Synthese von Mykotoxinen eine stärkere Pathogenität (Proctor et al. 1995). Sowohl für Deoxynivalenol als auch für Nivalenol ist beschrieben, dass die Produktion des Mykotoxins dem Pilz zwar nicht die Infektion an sich, wohl aber die Ausbreitung im Weizengewebe ermöglicht und damit eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielt (Lemmens et al., 2008). Welche Faktoren dabei für die Induktion der Mykotoxin-Synthese verantwortlich sind, wird später noch ausgeführt werden. Anhand von

Knock-out-Mutanten von *F. graminearum*, in denen für die Mykotoxin-Synthese essentielle Gene deletiert worden waren, konnte jedoch eine reduzierte Virulenz nachgewiesen werden (Proctor et al., 1995; Desjardins et al., 1996; Maier et al., 2006). Das Isolat von *F. graminearum*, das im Zuge dieser Arbeit mit DsRed transformiert wurde, gehört zu der Gruppe der Nivalenol-Bildner (de Mugrabi Kuppler et al., 2011). *F. avenaceum* bildet hingegen keine Trichothecene, sondern Beauvericin, Enniatin, ein zyklisches Peptid, und Moniliformin (Bottalico und Perrone 2002). Ob im Falle von *F. avenaceum* die gebildeten Mykotoxine ebenfalls die Rolle von Virulenzfaktoren während der Infektion und der Kolonisierung des Gewebes einnehmen, wurde bisher nur für das Enniatin beschrieben. Hier wird ebenfalls eine Beteiligung des Mykotoxins an der Virulenz von Stämmen von *F. avenaceum* angenommen (Herrmann et al., 1996). Bei den Mykotoxin-Analysen wurde in den Ähren, die mit der Kombination aus beiden *Fusarium*-Arten inokuliert worden waren, ein um 59% höherer Wert für Moniliformin ermittelt als in der Variante, die nur mit FAEGFP infiziert wurde. Moniliformin ist ein Inhibitor thyaminpyrophosphatabhängiger Enzyme (Burka et al., 1982; Gathercole et al., 1986; Pirrung et al., 1996), wie der Pyruvat-Dehydrogenase und der Ketoglutarat-Dehydrogenase, zweier Multienzymkomplexe, die die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) am Übergang der Glycolyse zum Citratzyklus und im Folgenden die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Succinyl-CoA zu Beginn des Citratzyklus katalysiert (Karlson et al., 1994). Diese beiden Stoffwechselwege sind zentrale Prozesse im Katabolismus von Kohlenhydraten, der in allen eukaryotischen Organismen gleichermaßen abläuft. Möglicherweise wird der DsRed-Transformant von *F. graminearum* durch die von dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* gebildeten Mengen an Moniliformin, das lebensnotwendige Stoffwechselwege hemmt, in seinem Wachstum beeinträchtigt.

Einem weiteren Mykotoxin, das in den untersuchten Ähren nachgewiesen wurde, und das von *F. avenaceum* gebildet wird, dem Enniatin, wird eine sowohl antibiotische als auch insektizide Wirkung zugeschrieben (Grove und Pople 1980; Desjardins, 2006). Die Toxizität des Enniatins rührt von seiner Fähigkeit her, die Membranpermeabilität zu erhöhen und die oxidative Phosphorylierung, die ebenso wie Glycolyse und Citratzyklus in allen aeroben Organismen abläuft, zu entkoppeln (Shemyakin et al., 1969). Auch dieses Mykotoxin wird neben dem Moniliformin von Herrmann et al. (1996) als Pathogenitätsfaktoren beschrieben, und ist daneben aber möglicherweise auch in der Lage, den Transformanten von *F. graminearum* in der Entwicklung und im Wachstum zu hemmen. Eventuell wird zudem die Wirkung des Moniliformins wegen der Fähigkeit des Enniatins den Ionentransport an den

Zellmembranen zu beeinflussen verstärkt (Bottalico 1998). Die beobachteten Unterschiede in den Konzentrationen für Moniliformin und Enniatin B waren allerdings nicht signifikant. Diese und die angeführten Interpretationen müssten aus diesem Grund in größer angelegten Experimenten verifiziert werden. Ein drittes Sekundärmetabolit, das ebenfalls häufig von *F. avenaceum* produziert wird, ist das Mykotoxin Beauvericin, ein zyklisches Depsipeptid (Logrieco et al., 2002). Seine Produktion ist auch in der Literatur explizit nicht für jedes Isolat beschrieben und konnte im Zuge der durchgeführten Mykotoxin-Analysen nicht nachgewiesen werden (Uhlir et al., 2006; Jestoi et al., 2008; Vogelgsang et al., 2008).

Im Hinblick auf die Produktion von Trichothecenen werden Isolate von *F. graminearum* in zwei Gruppen, den Deoxynivalenol- und den Nivalenol-Chemotyp, eingeteilt (Ichinoe et al., 1983; Jennings et al., 2004b; Ji et al., 2007). Das in dieser Arbeit verwendete Isolat zählt nach Mugrabi de Kuppler (2011) zu der Gruppe der NIV-Bildner, wobei parallel zu Nivalenol, wie es auch in der Literatur für den NIV-Chemotyp beschrieben wurde, außerdem dessen Vorstufe Fusarenon X nachgewiesen wurde (Ichinoe et al., 1983; Sydenham et al., 1991). Zusätzlich zu der Produktion von Nivalenol synthetisierte das transformierte Isolat von *F. graminearum* auch in geringen Mengen Deoxynivalenol. Dies wurde durch Ergebnisse anderer Untersuchungen, in denen ebenfalls beide Trichothecene produziert wurden, bestätigt (Bottalico und Perrone 2002; Szecsi et al., 2005). Allerdings existieren gegenteilige Berichte, in denen die ausschließliche Produktion eines der beiden Trichothecene dokumentiert wird (Ichinoe et al., 1983). Die Beobachtung, dass die Trichothecen-Synthese durch *F. graminearum* in Anwesenheit von *F. avenaceum* ansteigt, wurde in früheren Studien bereits für Deoxynivalenol beschrieben (Moradi 2008). Allerdings wurde hier im Falle von *F. graminearum* keine Unterschiede in der Biomasse im Vergleich von Einzel- und Doppelinokulation festgestellt. In der vorliegenden Arbeit hingegen war das Wachstum des Transformanten von *F. graminearum* in Kombination mit dem Transformanten von *F. avenaceum* deutlich eingeschränkt, was möglicherweise mit denen im Folgenden geschilderten Vorgängen erklärt werden kann. In der Literatur wird allerdings auch beschrieben, dass für Isolate von *F. graminearum*, die zu der Gruppe der NIV-Bildner gehören, ein langsames Fortschreiten der Krankheit charakteristisch ist (Maier et al., 2006).

Bei der Besiedlung einer Pflanze durch ein Pathogen werden in der Pflanze eine Reihe von Abwehrmaßnahmen in Gang gesetzt (Boutigny et al., 2008). In einem sehr frühen Stadium der Infektion mit einem peritrophen Pilz werden im Zuge dieser Abwehrmaßnahmen in stark erhöhtem Maße die sogenannten Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die oxidativen Stress auslösen, und zu denen Verbindungen wie

Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hyperoxide (O_2^{2-}) und Hydroxyradikale ($\text{HO}\cdot$) zählen (Lamb und Dixon 1997; Repka 1999). Neben weiteren anderen Funktionen steht die Synthese von Sekundärmetaboliten, zu denen die Mykotoxine gehören, unter der Kontrolle von ROS (Reverberi et al., 2010). Die Pflanze ist also durch die Bildung von ROS indirekt in der Lage, die Bildung von Mykotoxinen zu induzieren. Dass die Synthese von Deoxynivalenol also auch durch oxidativen Stress ausgelöst werden kann, wurde allerdings bisher nur bei Experimenten *in vitro* gezeigt, die Bestätigung dieser Beobachtung in der Pflanze steht jedoch noch aus (Ochiai et al., 2007; Gardiner et al., 2009). Für das Mykotoxin Deoxynivalenol wurde wiederum beschrieben, dass dieses seinerseits dazu befähigt ist, die Produktion von H_2O_2 zu induzieren und in der Folge durch Veränderungen von Zellen und deren Tod das nekrotrophe Wachstum zu fördern (Desmond et al., 2008). Durch diesen Vorgang und die damit einhergehende weitere Freisetzung von H_2O_2 findet dann eine weitere Stimulation der Synthese von Deoxynivalenol statt, und es entsteht ein Kreislauf, der dem Pathogen eine erleichterte Aufnahme von Nährstoffen und damit auch eine schnellere Besiedlung der Pflanze ermöglicht.

Aufgrund der Ähnlichkeit von Deoxynivalenol und Nivalenol können möglicherweise ähnliche Schlüsse die Wirkung dieses Mykotoxins betreffend gezogen werden. Der Transformant von *F. avenaceum* wäre durch die schnellere Besiedlung durch den Transformanten von *F. graminearum* und der bereits ausgelösten Pathogenabwehr der Pflanze in Form von H_2O_2 dieser Verbindung von Anfang an ausgesetzt. Wie in der Literatur für Untersuchungen von *F. graminearum* in Flüssigkulturen geschildert, findet keine Hemmung des Wachstums mehr statt, wenn das Pathogen von Anfang an dieser Substanz ausgesetzt ist und an diese adaptieren kann (Ponts et al., 2006). Im Fall des Transformanten von *F. graminearum* dagegen wurde deren Synthese aber erst durch die einsetzende Abwehrantwort der Pflanze und die ansteigende Konzentration an Nivalenol induziert und der Pilz im Wachstum gehemmt. Die gesteigerte Synthese der anderen Mykotoxine, die von *F. avenaceum* gebildet wurden, ist dann möglicherweise ebenfalls durch die durch das freigesetzte H_2O_2 herbeigeführte Induktion der Mykotoxin-Produktion analog zu den Beobachtungen bei Deoxynivalenol zu erklären.

Als eine weitere Antwort einer Pflanze auf die Infektion durch ein Pathogen verfügt diese über eine Reihe von phenolischen Zellwandkomponenten wie Ferulasäure, die im Pflanzenreich weit verbreitet ist und frei, löslich und konjugiert mit der extrazellulären Matrix oder zellwandgebunden, aber unlöslich, vorliegt (Sosulski et al., 1982; Hartley und Ford; McKeehen et al., 1999). Der Gehalt dieser nach Kim und Lee (2004) am häufigsten

auftretenden Phenolsäure in den Zellwänden der äußeren Schichten eines Weizenkorns wie Perikarp und Aleuronschicht in Form von Mono- und Dimeren (Bakan et al., 2003) steigt im Laufe der Abreife kontinuierlich an (McKeehen et al., 1999). In pflanzlichen Zellwänden kommt Ferulasäure zum größten Teil in ihrer gebundenen Form vor, wobei sie hier kovalent über Esterbrücken mit Zellwandpolysacchariden wie Arabinoxylan in Form von FAXX (O-[5-O(trans-Feruloyl)- α -L-Arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-Xylopyranose) oder Pektin verbunden ist. Sie verleiht der Zellwand mechanische Stärke und ist ein starkes Antioxidant (Kim und Lee 2004). Eine andere Variante des Einbaus in die Zellwände ist die Komplexbildung mit Amiden, die allerdings nur in Meristemen, Reproduktionsorganen und Samen als häufigste phenolische Zellwandkomponente zu finden ist (Martin-Tanguy et al., 1982). Diesen Komplexen wird ein möglicher toxischer Effekt auf Pilze zugeschrieben (Arnason et al., 1992). Unter Umständen ist dieser Komplex für das vergleichsweise eingeschränkte Wachstum des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* gegenüber dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* in der Kombinationsvariante verantwortlich, wobei auf letzteren kein Effekt zu beobachten ist.

Ferulasäure liegt in Sorten, die gegen die Partielle Taubährigkeit resistent sind wie Sumai 3 oder Fan 9, nach Inokulation mit *F. graminearum* in deutlich höheren Mengen vor als in sensitiven Kultivaren wie Ningmai 6 oder Xuzhou 21 (Yao et al., 1996; Lempereur 1997; Hamzehzarghani et al., 2005; Moore et al., 2006; Paranidharan et al., 2008). Zusätzlich wurde in der Literatur an zahlreichen Stellen ein inhibitorischer Effekt dieser phenolischen Komponente auf die Trichothecen-Biosynthese beschrieben (Bakan et al., 2003; Bily et al., 2003). Da der für diese Arbeit verwendete Sommerweizen der Sorte Tybalt zu den für *Fusarium*-Befall anfälligen Sorten zählt, muss man hier also von einem geringeren Gehalt an Ferulasäure in den Zellwänden ausgehen. Trotzdem ist die Menge, die nach der Pilzinfektion in den Ähren mittels HPLC noch nachzuweisen war, erheblich höher als die im Zuge der Wachstumstests auf Agar mit unterschiedlichen Ferulasäure-Konzentrationen ermittelte, für beide Pilze fungistatische, Konzentration von 400 μ g/ml unkonjugierter Ferulasäure. Allerdings wurde hier die in der Zellwand gebundene Ferulasäure erfasst, die in dieser Form nicht den toxischen Effekt und die oben beschriebene Inhibition der Trichothecen-Synthese zur Folge haben kann (Bakan et al., 2003; Bily et al., 2003). Freie Ferulasäure wurde in den Ähren nicht nachgewiesen. In Untersuchungen *in vitro* wurde aber gezeigt, dass Ferulasäure innerhalb von achtundvierzig Stunden aus dem Medium verschwindet, wobei hier Metabolismus, Abbau oder Aufnahme in die Zellen der Pilze als mögliche Gründe angegeben werden (Boutigny et al., 2009). Durch die Aktivität von pilzlichen Feruloyl-Esterasen wird

das oben erwähnte Feruloyl-Arabinosylan in den Weizenkörnern hydrolysiert (McCallum et al., 1992). Eventuell reicht die vor allem in der Kombinationsvariante möglicherweise freigesetzte höhere Konzentration an Ferulasäure aber nicht aus, um einen inhibitorischen Einfluss auf den Transformanten von *F. avenaceum* auszuüben. Andererseits ist *F. graminearum* aber der toxischen Wirkung bedingt durch sein schnelleres Wachstums und der früheren Sekretion von Esterasen stärker ausgesetzt. Zwar wird immer nur ein kleiner Teil frei, dem wird aber auch in anderen Untersuchungen diese Wirkung zugeschrieben (Bily et al., 2003). Das auch in der Literatur angenommene Zusammentreffen von Pilz und Ferulasäure und deren toxische Wirkung sind daher für *F. avenaceum* unwahrscheinlicher, da dieser langsamer wächst. Die Produktion von Esterasen durch diese *Fusarium*-Art ist aufgrund der schon erfolgten Zellwandlyse durch Esterasen von *F. graminearum* möglicherweise nur noch eingeschränkt von Nöten. Eine Neubildung von Ferulasäure ist aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Versuchspflanzen um Sommerweizen handelt, vermutlich nicht zu rechnen (Reid et al., 1992). Hierauf wird später noch genauer eingegangen.

In den Mittelstücken der Ähren, die entweder mit dem EGFP-Transformant von *F. avenaceum* oder dem DsRed-Transformant von *F. graminearum* inokuliert worden waren, fand im Falle von *F. graminearum* keine enzymatische Freisetzung von Ferulasäure aus der Bindung mit der Zellwand im Vergleich mit der Kontrolle statt, bei *F. avenaceum* hingegen zu einem geringen, allerdings ebenfalls nicht signifikanten, Anteil. Generell sind jedoch beide Transformanten in der Lage Ferulasäure abzubauen. Dies wurde anhand der deutlichen Abnahme des Ferulasäure-Gehaltes von anfänglichen 400 µg/ml in Agarplatten nach Wachstum beider Klone nachgewiesen.

In der Kombinationsvariante jedoch war ein signifikant geringerer Gehalt an Ferulasäure im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. In diesen Proben wurde mittels Real-time PCR ein höherer DNA-Gehalt für FAVEGFP nachgewiesen als in der Einzelvariante. Aus diesem Grund wäre dann auch mit einer stärkeren Esterase-Expression zu rechnen, was den geringeren Gehalt an in den Ähren verbliebener Ferulasäure erklären würde. Möglicherweise übt diese erhöhte Menge an freigesetzter Ferulasäure nun einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum des DsRed-Transformanten von *F. graminearum* aus, der in Kombination mit dem EGFP-Transformant von *F. avenaceum* deutlich beeinträchtigt war. Da es sich bei dem Weizen aber um eine sensitive Sorte handelt, wird die Biosynthese von Nivalenol nicht beeinträchtigt. Wie in der Literatur für sensitive Maissorten beschrieben, nimmt der Ferulasäure-Gehalt durch Abbau durch *Fusarium*-Arten nicht nur ab, sondern zusätzlich wird

eine erneute Synthese von Ferulasäure durch die Wirkung von Trichothecenen, die hier in deutlich höherer Konzentration vorlagen, inhibiert (Reid et al., 1992). Die dadurch bedingte geringere Konzentration der antioxidativ wirksamen Ferulasäure hat demnach möglicherweise eine höhere Konzentration von H_2O_2 zur Folge, dessen einerseits hemmende Wirkung auf das Wachstum von *F. graminearum* in diesem Experiment oben bereits diskutiert wurde. Andererseits induziert diese erhöhte H_2O_2 -Konzentration, wie desgleichen oben schon ausgeführt, die Nivalenol-Synthese. Diese besteht aus einer Reihe von Oxidationen und umfasst im Falle von *Fusarium* spp. nach Desjardins (2006) mindestens fünfzehn verschiedene Schritte, wobei der erste von ihnen bei allen trichothecensynthetisierenden *Fusarium*-Arten konserviert ist. In diesem Schritt wird Farnesylpyrophosphat durch die Aktivität der Sesquiterpen-Synthase (Trichodien-Synthase), kodiert durch TRI15, umgewandelt (Hohn und Beremand 1989). Die folgende Kette von Oxidationen und Veresterungen betreffend existieren Unterschiede sowohl zwischen den Arten als auch zwischen Isolaten, was zu der Synthese der verschiedenen Trichothecene wie z. B. Nivalenol und T2-Toxin führt. Aufgrund der Tatsache, dass die Nivalenol-Synthese sich aus einer Reihe von Oxidationen zusammensetzt, greifen Veränderungen der oxidativen Gegebenheiten in der Umgebung in den Sekundärmetabolismus und damit in die Biosynthese von Trichothecenen ein (Ponts et al., 2006; Ponts et al., 2007). Die Produktion von Sekundärmetaboliten wird als Reaktion der Pilze diskutiert, durch die die Akkumulation von ROS in den Zellen kompensiert wird (Reverberi et al., 2010).

Unter Umständen steht das stärkere Wachstum des Transformanten von *F. avenaceum* aber auch im Zusammenhang mit der Wirkung, die mögliche Stoffwechselprodukte von *F. graminearum* auf die Entwicklung dieses Ascomyceten haben können. In der Literatur wurde im Zuge von Untersuchungen *in vitro* festgestellt, dass allein schon die Zugabe von Ethanol, einem Stoffwechselprodukt vieler Pilze, zu einem Minimalmedium die Bildung von Biomasse durch *F. avenaceum* um mehr als das Zehnfache erhöht (Asiegbu 2000). Möglicherweise wird auch durch den Metabolismus des Transformanten von *F. graminearum* Ethanol freigesetzt, das dann den soeben beschriebenen positiven Effekt auf das Wachstum des Transformanten von *F. avenaceum* ausübt. Verstärkt wurde dieser Effekt *in vitro* noch durch die Zugabe von Glukose, die der Grundbaustein des Zellwand-Polysaccharids Zellulose ist (Asiegbu 2000). Im Laufe der Infektion durch ein Pathogen wird die Zellulose durch die Aktivität von hydrolytischen Enzymen abgebaut. Da wie bereits diskutiert die Hydrolasen des Transformanten von *F. graminearum* womöglich zu einem früheren Zeitpunkt aktiv werden

als die des Transformanten von *F. avenaceum*, wird Glukose freigesetzt und bietet *F. avenaceum* in Verbindung mit dem Metabolit Ethanol bessere Wachstumsbedingungen.

In der Kombinationsvariante mit beiden Transformanten war durch die stärkere Freisetzung von Ferulasäure im Falle von *F. avenaceum* kein inhibitorischer Effekt auf die Bildung von Biomasse festzustellen. Man könnte interpretieren, dass Ferulasäure in dieser Variante zwar in höheren Mengen freigesetzt wird, die fungistatische Wirkung aber durch das Stoffwechselprodukt Ethanol von *F. graminearum* aufgehoben wird. Sogar die fungistatische Wirkung einer Ferulasäure-Konzentration von 25 mg/ml wurde durch die Zugabe von Ethanol aufgehoben, und die Produktion von Biomasse stieg *in vitro* um mehr als das Zehnfache an (Asiegbu 2000). Diese Beobachtung kann unter Umständen auf die Entwicklung von *F. avenaceum* an den Ähren in Kombination mit *F. graminearum* übertragen werden. Bezogen auf den Gehalt an in den Ähren verbliebener Ferulasäure in den Kontrollen war die Konzentration an freigesetzter Ferulasäure vermutlich nicht so hoch wie diese, die in dem Experiment *in vitro* verwendet wurde. Daher wurde auch keine Biomassezunahme von *F. avenaceum* in diesem Ausmaße beobachtet. Trotzdem hatte dieser verglichen mit *F. graminearum* einen Wachstumsvorteil, der unter Umständen durch die Freisetzung von Ethanol durch *F. graminearum* bedingt war. Der inhibitorische Effekt, der von der Ferulasäure ausgeübt wurde, wurde zudem auch durch die Zugabe von Zellobiose, dem Disaccharid, aus dem sich Zellulose zusammensetzt, und von Glukose aufgehoben (Asiegbu 2000).

Weiteren Berichten zufolge besitzt Ferulasäure die Fähigkeit, die Produktion und Sekretion bestimmter zellwandlytischer Enzyme zu steigern (Asiegbu et al., 1996; Johansson et al., 1998). Der Stress, der durch die toxische Wirkung der Ferulasäure ausgeübt wird und dem *F. graminearum* unter Umständen früher ausgesetzt ist als *F. avenaceum*, führt im Folgenden dann, wie auch in der Literatur angenommen, zu einer gesteigerten Sekretion von Zellwand-Hydrolasen, während die Produktion von Biomasse jedoch eingeschränkt ist. Möglicherweise betraf diese Wirkung aber nur *F. graminearum*, da *F. avenaceum* wegen der schon dargelegten Gründe eine erhöhte Produktion von Biomasse zeigte. In Teilstück B (unterhalb des inokulierten Abschnitts) wurde nur in den Ähren, die mit DsRed-Transformanten von *F. graminearum* und mit der Kombination aus diesem mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* inokuliert worden waren, signifikant geringere Gehalte an Ferulasäure gemessen. Dies passt zu der Beobachtung, dass auch nur in diesen Proben Pilz-DNA, nämlich die des Transformanten von *F. graminearum*, nachgewiesen werden konnte.

Demnach waren auch nur in diesen Proben Feruloyl-Esterasen vorhanden, die für den Abbau der Ferulasäure aktiviert werden konnten.

Bei Literaturrecherchen stößt man auch auf weitere Substanzen, die ähnliche Effekte bewirken. Beim Einsatz von Fungiziden wird analog zu der oben geschilderten Wirkung der Ferulasäure auf die Sekretion von zellwandlytischen Enzymen und dem Wachstum der Pathogene in der Literatur ein ähnliches Phänomen beschrieben. 1990 wurde in Feldversuchen des Pflanzenschutzamtes des Landes Schleswig-Holstein die hemmende Wirkung des azolhaltigen Fungizids Matador (Tebuconazole/Triadimenol) auf das Wachstum von *F. culmorum* beobachtet (Anonym 1990). Dieser Fungizidtyp greift hemmend in die Biosynthese von Ergosterol, das eine essentielle Komponente der pilzlichen Zellmembranen ist, ein und bringt auf diese Art und Weise das Wachstum der Pilzhypen zum Erliegen. In weiterführenden Studien wurde der Einfluss des Fungizideinsatzes auf die Produktion verschiedener Mykotoxine in mit diesem Pathogen infiziertem Weizen untersucht. Dabei ergab sich ein stark erhöhter Gehalt an Nivalenol, das ebenso wie die zellwandlytischen Hydrolasen zu den Pathogenitätsfaktoren von *Fusarium* spp. zählt (Gareis und Ceynowa 1994). Das Ausmaß der Erkrankung nahm zwar ab, wobei, wie in sich in anderen Studien herausstellte, nicht nur eine Reduktion des pilzlichen Hyphenwachstums beschrieben wurde, sondern *in vitro* auch morphologische und cytochemische Veränderungen der Pilzstrukturen auftraten (Kang et al., 2001a; Kang et al., 2001b). Dieser für sich genommen positive Effekt der Fungizidbehandlung wurde jedoch durch eine in der Folge drastische Stimulierung der Produktion von Mykotoxinen relativiert. Als eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wird die Wirkung des Fungizids analog zur toxischen Wirkung der Ferulasäure als zusätzlicher Stressfaktor diskutiert, durch den die Aktivität der an der Biosynthese von Mykotoxinen beteiligten Enzyme angeregt wird (Edwards et al., 2001; Magan et al., 2002).

Des Weiteren existiert eine Reihe von zusätzlichen Studien, die ebenfalls belegen, dass subletale Mengen verschiedener Fungizide eine Steigerung der Mykotoxin-Synthese sowohl bei Vertretern der Gattung *Fusarium* als auch bei Arten anderer Gattungen zur Folge haben (Moss und Frank 1985; Milus und Parsons 1994; D'Mello et al., 1998). Hierbei ist eine weitere Gruppe von Fungiziden, die Strobilurine, hervorzuheben, die erst seit 1996 auf dem Markt erhältlich sind und deren Leitstruktur auf fungiziden Naturstoffen gründet. Die Wirkung dieser Substanzen beruht auf einer spezifischen Hemmung der mitochondrialen Atmungskette in den Pilzzellen durch Blockierung des Elektronentransports. Die hieraus resultierende, reduzierte Energieproduktion führt zu einer Hemmung des pilzlichen Wachstums. Bei anderen Studien wurde nach Applikation von Azoxystrobin ein Anstieg der

Produktion von Deoxynivalenol durch *F. culmorum* beobachtet, obgleich keine signifikante Zunahme der pilzlichen Biomasse zu verzeichnen war (Simpson et al., 2001). Die Applikation von strobilurinholdigen Fungiziden in frühen Wachstumsstadien von Weizenpflanzen wird als Risikofaktor für eine erhöhte Synthese des Trichothecens Deoxynivalenol beschrieben (Ellner 2005).

Aber auch für andere Mykotoxine wurden vergleichbare Erkenntnisse gewonnen. So nimmt die Biosynthese von T-2-Toxin durch *F. acuminatum* signifikant zu, wenn Sorbinsäure in subinhibitorischen Konzentrationen appliziert wird, da das Fungizid die Aktivität der in den Tricarbonsäurezyklus involvierten Enzyme inhibiert. Der hieraus resultierende Anstieg von Acetyl-Coenzym-A, das als Ausgangssubstanz der Trichothecen-Synthese dient, verursacht vermutlich die erhöhte Produktion des Mykotoxins (Gareis et al., 1984). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Biosynthese von T-2-Toxin durch *F. sporotrichoides* gemacht, die nach Anwendung des Fungizids Tridemorph stimuliert wurde (Moss und Frank 1985).

In Anbetracht der beschriebenen Phänomene gelangt man zu dem Schluss, dass pflanzenpathogene, mykotoxinogene Pilze auf eine Reihe antimikrobieller Substanzen ähnlich reagieren. Hierbei ist es unerheblich, ob diese pflanzlichen Ursprungs sind, wie zum Beispiel die Ferulasäure, oder ob sie von Pilzen produziert werden wie zum Beispiel die Gruppe der Strobilurine. Das Wachstum und die Produktion von Biomasse durch das Pathogen werden durch die toxische Wirkung zum Teil erheblich beeinträchtigt und die Synthese von Mykotoxinen wird in Folge des gesteigerten Stresses erhöht.

Am Ende dieser Arbeit ist zu erkennen, dass die Interaktionen, die zwischen verschiedenen *Fusarium*-Arten auftreten, ausgesprochen komplexer und unerwarteter Natur sind. Im Falle von *F. avenaceum* liegt ein additiver Effekt vor, da dieser Pilz in Gegenwart von *F. graminearum* offenbar zumindest einen Vorteil erhält. Daraus muss man folgern, dass ersterer in dieser Kombination eine größere Schädigung besitzt. Diese wird noch verstärkt durch die gesteigerte Nivalenol-Synthese durch *F. graminearum* in der Kombination mit *F. avenaceum*, die eine Folge des erhöhten Stress bedingt durch den Konkurrenzdruck durch die Anwesenheit der anderen Art ist. Die Folge dieser Mechanismen ist eine erhöhte Kontamination des Getreides. Im Falle von *F. graminearum* ist, die Pilzentwicklung betreffend, ein antagonistischer Effekt zu verzeichnen. *F. graminearum* wird durch das Wachstum von *F. avenaceum* zurückgedrängt, obwohl er als deutlich aggressiver beschrieben wird. In der Literatur wird diese Form der Interaktion als Agonismus bezeichnet (Lewis 1973; Francis und Read 1995). Hierbei erhält der eine von zwei Mikroorganismen einen Vorteil

durch die Anwesenheit des anderen, während dieser wiederum geschädigt wird. Es ist also festzuhalten, dass eine wechselseitige Beeinflussung zu beobachten ist, was im Hinblick auf die Entwicklung von Ährenfusariosen, die sich daraus ergebende Belastung des Erntegutes und die Populationsdynamik in Weizenbeständen von Bedeutung ist.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte die Untersuchung der Interaktionen zwischen verschiedenen Arten der Pilzgattung *Fusarium* an der Wirtspflanze Weizen zum Gegenstand. Die im Zuge der Experimente gewonnenen Erkenntnisse sollten eventuell als Grundlage für eine Bekämpfungsstrategie dienen, die auf dem Einfluss beruht, den eine *Fusarium*-Art auf die andere auszuüben in der Lage ist.

- Um dies *in situ* zu untersuchen, wurden die beiden unterschiedlich aggressiven *Fusarium*-Arten *F. avenaceum* und *F. graminearum* mit den Genen für die fluoreszierenden Reporterproteine EGFP und DsRed-Express transformiert, um die Auffindung des Myzels im Zuge mikroskopischer Untersuchungen im Weizengewebe zu erleichtern.
 - Die Transformation von protoplastiertem Myzel je eines Isolates von *F. avenaceum* und von *F. graminearum* (Nivalenol bildendes Isolat) mit den Reporterproteinen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie antibiotikaresistenter Transformanten nachgewiesen.
 - Beide fluoreszierenden Proteine verblieben im Cytosol der pilzlichen Zellen, da die per Transformation übertragene Gensequenz kein Transportsignal beinhaltete.
 - Die Reporterproteine wurden sowohl im Myzel als auch in den Konidien beider *Fusarium*-Arten exprimiert.
 - Die Integration der Gene für die Reporterproteine wurde in beiden *Fusarium*-Arten mittels genetischer Analyse bestätigt.
- Da die Integration der Fremdgene in das Pilzgenom zufällig erfolgte, wurde anhand verschiedener Parameter *in vitro* ermittelt, ob die Transformation zu deren Veränderungen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp geführt hatte.
 - Die Bestimmung des Myzelwachstums auf einem Minimal- und einem Vollmedium, ergab, dass durch die Transformation keine für das Wachstum essentiellen Gene deletiert worden waren.
 - Die Sporulation der Transformanten und der Wildtypen beider Pilzarten wurde durch die Integration der Gene für die Reporterproteine nicht beeinträchtigt.

- Durch Bonitur der Symptomentwicklung an Weizenblättern wurde der Nachweis erbracht, dass die Fähigkeit beider *Fusarium*-Arten ihre Wirtspflanze zu infizieren durch die Genintegration nicht beeinträchtigt worden war.
- Zur Charakterisierung möglicher Interaktionen zwischen den beiden *Fusarium*-Arten wurden unterschiedliche Tests und Analysen durchgeführt.
 - Bei Konfrontationsassays mit Transformanten und Wildtypen beider Arten auf einem festen Medium wurde keine sichtbare Hemmung des Wachstums bedingt durch die Anwesenheit der jeweils anderen Art beobachtet.
 - Die quantitative Bestimmung der Pilzmasse anhand des DNA-Gehaltes im Laufe der Infektion von Weizenähren mit Hilfe von TaqMan® Real-time PCR ergab mit 188 ng/pg nach einundzwanzig Tagen einen signifikant höheren DNA-Gehalt des Transformanten von *F. avenaceum* in Ähren, die mit der Kombination mit dem Transformanten von *F. graminearum* inokuliert worden waren.
 - Ein generell schnelleres Wachstum war auf Seiten des Transformanten von *F. graminearum* zu beobachten. In Kombination mit dem Transformanten von *F. avenaceum* wurden im Vergleich zur Einzelvariante nur 88, 92 und 62% des DNA-Gehaltes von *F. graminearum* ermittelt. Nach vierzehn bzw. einundzwanzig Tagen traten signifikante Unterschiede zwischen der Einzel- und der Kombinationsvariante auf.
 - Durch die Analyse von zweiunddreißig verschiedenen Mykotoxinen mittels LC-MS/MS wurde mit 55,3 µg/g ein signifikant höherer Gehalt an Nivalenol in den Weizenähren nachgewiesen, die mit der Kombination aus beiden *Fusarium*-Arten infiziert worden waren. Ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede bei den Konzentrationen von Enniatin B, Moniliformin, Fusarenon X und Deoxynivalenol zwischen der Einzel- und der Kombinationsvariante detektiert werden.
- Bei der Untersuchung der Reaktion der beiden Transformanten von *F. avenaceum* und *F. graminearum* auf NIV und DON in einer Konzentration von 10 mg/ml wurde in Myzelwachstumstests keinerlei Effekt, weder Wachstumshemmung noch -förderung, durch die Anwesenheit der Mykotoxine beobachtet.

- Sowohl Wildtypen als auch Transformanten beider *Fusarium*-Arten besitzen die Fähigkeit, die pflanzliche Zellwandkomponente Ferulasäure abzubauen.
- Der Gehalt an Ferulasäure war in den Ährenabschnitten, die mit der Kombination aus den Transformanten der beiden *Fusarium*-Arten inokuliert worden waren, mit 1588 µg/g TG geringer als in den Einzelvarianten. Nach Inokulation mit dem EGFP-Transformanten von *F. avenaceum* betrug der Gehalt an Ferulasäure 1938 µg/g TG und nach Inokulation mit dem DsRed-Transformanten von *F. graminearum* 2058 µg/g TG.
- Zusammenfassend ist zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen den beiden *Fusarium*-Arten zu sagen, dass *F. avenaceum* in der Lage ist, *F. graminearum* in seinem Wachstum zu hemmen. Dieser Pilz wiederum reagiert in der durch die Anwesenheit des Nahrungskonkurrenten ausgelösten Stresssituation mit der verstärkten Bildung des Mykotoxins Nivalenol. Diese Ergebnisse sind für die Entwicklung der durch diese Getreidepathogene verursachten Krankheit, die Populationsdynamik dieser Pilze innerhalb der Bestände und den Auswirkungen auf das geerntete Getreide von unzweifelhafter Relevanz.

Literaturverzeichnis

- Abbas, H. K.; Mirocha, C. J.; Berdal, B. P.; Sundheim, L.; Gunther, R.; Johnsen, B. (1987): Isolation and Toxicity of *Fusarium* Species from Various Areas of Norway. *Acta Agriculturae Scandinavica* 37 (4), 427–435
- Abuodeh, R. O.; Orbach, M. J.; Mandel, M. A.; Das, A.; Galgiani, J. N. (2000): Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of Infectious Diseases* 181 (6), 2106–2110
- Adams, G.; Johnson, N.; Leslie, J.; Hart, L. (1987): Heterokaryons of *Gibberella zeae* formed following hyphal anastomosis or protoplast fusion. *Experimental Mycology* 11 (4), 339–353
- Agrios, G. N. (2005): *Plant Pathology*. 5. Auflage, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande
- Albersheim, P.; Anderson-Prouty, A. J. (1975): Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. *Annual Review of Plant Physiology* 26 (1), 31–52
- Anonym (1990): Versuchsbericht des Pflanzenschutzdienstes des Landes Schleswig-Holstein, Ministerium für Landwirtschaft, Forsten und Fischerei
- Anonym (2007): Beschreibende Sortenliste Getreide. Bundessortenamt, Hannover
- Arnason, J.; Gale, J.; Conilhdebeyssac, B.; Sen, A.; Miller, S.; Philogene, B. et al. (1992): Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects, *Prostephanus truncatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch.). *Journal of Stored Products Research* 28 (2), 119–126
- Asiegbu, F. O. (2000): Effects of carbohydrates, ethanol and selected cell wall phenolics on in vitro growth of necrotrophic fungi — *Heterobasidion annosum* and *Fusarium avenaceum*. *Journal of Basic Microbiology* 40 (3), 139–148
- Asiegbu, F. O.; Paterson, A.; Smith, J. E. (1996): Inhibition of cellulose saccharification and glycolignin-attacking enzymes of five lignocellulose-degrading fungi by ferulic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12 (1), 16–21
- Assabgui, R. A.; Reid, L. M.; Hamilton, R. I.; Arnason, J. T. (1993): Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 83, 949–953

- Bai, G.-H; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D. (2002): Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153 (2), 91–98
- Bai, S.; Shaner, G. (1994): Scab of wheat: Prospects for control. *Plant disease* 78 (8), 760–766
- Bakan, B.; Bily, A. C.; Melcion, D.; Cahagnier, B.; Regnault-Roger, C.; Philogène, B. J. R.; Richard-Molard, D. (2003): Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (9), 2826–2831
- Barber, M. S.; Bertram, R. E.; Ride, J. P. (1989): Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34 (1), 3–12
- Bast, E. (2001): Mikrobiologische Methoden - Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 2.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Bell, A. A. (1981): Biochemical mechanisms of disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32 (1), 21–81
- Besle, J.-M; Cornu, A.; Jouany, J.-P (1994): Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 64 (2), 171–190
- Bevis, B. J.; Glick, B. S. (2002): Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology* 20 (1), 83–87
- Bily, A. C.; Reid, L. M.; Taylor, J. H.; Johnston, D.; Malouin, C.; Burt, A. J. et al. (2003): Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93 (6), 712–719
- Boenisch, M. J.; Schäfer, W. (2011): *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology* 11 (1), 110
- Boller, T. (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46 (1), 189–214
- Bottalico, A. (1998): *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80 (2), 85–103

- Bottalico, A.; Perrone, G. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108 (7), 611–624
- Boutigny, A.-L.; Barreau, C.; Atanasova-Penichon, V.; Verdal-Bonnin, M.-N.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. (2009): Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113 (6-7), 746–753
- Boutigny, A.-L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. (2008): Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121 (4), 411–423
- Brennan, J. M.; Fagan, B.; van Maanen, A.; Cooke, B. M.; Doohan, F. M. (2003): Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109 (6), 577–587
- Brown, N. A.; Urban, M.; van de Meene, A. M. L.; Hammond-Kosack, K. E. (2010): The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology* 114 (7), 555–571
- Burka, L.; Doran, J.; Wilson, B. (1982): Enzyme inhibition and the toxic action of moniliformin and other vinylogous α -ketoacids. *Biochemical Pharmacology* 31 (1), 79–84
- Burmeister, H. R. (1987): Enniatin production by *Fusarium tricinctum* and its effect on germinating wheat seeds. *Phytopathology* 77 (10), 1483
- Bushnell, W. R.; Hazen, B. E.; Pritsch, C. (Hg.) (2003): Histology and physiology of *Fusarium* head blight. W. R. Bushnell und J. Leonard, *Fusarium* Head Blight of wheat and barley. St. Paul, MN: APS Press, 44-83
- Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 (5148), 802–805
- Champeil, A.; Doré, T.; Fourbet, J.F (2004): *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166 (6), 1389–1415
- Ciopraga, J.; Gozia, O.; Tudor, R.; Brezuica, L.; Doyle, R. (1999): *Fusarium* spp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1428 (2-3), 424–432

Collinge, D. B.; Kragh, K. M.; Mikkelsen, J. D.; Nielsen, K. K.; Rasmussen, U.; Vad, K. (1993): Plant chitinases. *The Plant Journal* 3 (1), 31–40

Cormack, B. P.; Valdivia, R. H.; Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173 (1), 33–38

Covert, S. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research* 105 (3), 259–264

Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20 (11), 448–455

Cuomo, C. A.; Guldener, U.; Xu, J.-R.; Trail, F.; Turgeon, B. G.; Di Pietro, A. et al. (2007): The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317 (5843), 1400–1402

Czymmek, K. J.; Bourett, T. M.; Howard, R. J. (1996): Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrylate de-embedding. *Journal of Microscopy* 181 (2), 153–161

Desjardins, A. E. (2006): *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics and biology. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA

Desjardins, A. E.; Proctor, R. H.; Bai, G.-H.; McCormick, S. P.; Shaner, G.; Buechley, G.; Hohn, T. M. (1996): Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 775–781

Desmond, O. J.; Manners, J. M.; Stephens, A. E.; Maclean, D. J.; Schenk, P. M.; Gardiner, D. M. et al. (2008): The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9 (4), 435–445

Dickson, J. G.; Green, M. L. (1929): Scab of wheat and barley and its control. USDA Farmers' Bulletin 1599, 1-18

D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C.; Postel, D.; Dijksma, W. T. P.; Dujardin, A.; Placinta, C. M. (1998): Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology* 104 (8), 741–751

- Durand, N.; Reymond, P.; Fevre, M. (1991): Transformation of *Penicillium roqueforti* to phleomycin- and to hygromycin B-resistance. *Current Genetics* 19 (2), 149–153
- Edwards, S. G.; Pirgozliev, S. R.; Hare, M. C.; Jenkinson, P. (2001): Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4), 1575–1580
- Ellner, F. M. (2005): Results of long-term field studies into the effect of strobilurin containing fungicides on the production of mycotoxins in several winter wheat varieties. *Mycotoxin Research* 21 (2), 112–115
- Fehrmann, H.; Duben J. (1980): Vorkommen und Pathogenität von *Fusarium*-Arten an Winterweizen in der Bundesrepublik Deutschland, IV Abhängigkeit des *Fusarium*-Befalls von Standorteigenschaften und anderen Faktoren. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* (87), 281–289
- Fincham, J. R. (1989): Transformation in fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 53 (1), 148–170
- Finer, J. J.; Finer, K. R.; Ponappa, T. (1999): Particle bombardment mediated transformation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 240, 60–80
- Finkelstein, D. B. (1992): Transformation. *Biotechnology* 21, 113–156
- Fisher, N.; Burgess L. W.; Toussoun T. A.; Nelson P. E. L.: Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 1982, 151–153
- Francis, R.; Read, D. J. (1995): Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community. *Canadian Journal of Botany* 73, 1301–1309
- Fulcher, R. G. (1982): Fluorescence microscopy of cereals. *Food Microstructure* 1, 167–176
- Gardiner, D. M.; Osborne, S.; Kazan, K.; Manners, J. M. (2009): Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology* 155 (9), 3149–3156
- Gareis, M.; Ceynowa, J. (1994): Einfluss des Fungizids Matador (Tebuconazole/Triadimenol) auf die Mykotoxinbildung durch *Fusarium culmorum*. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -forschung* 198 (3), 244–248

- Gareis, M.; Bauer, J.; Montgelas, A. von; Gedek, B. (1984): Stimulation of aflatoxin B1 and T-2 toxin production by sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (2), 416–418
- Gathercole, P. S.; Thiel, P. G.; Hofmeyr, J. H. (1986): Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex by moniliformin. *The Biochemical Journal* 233 (3), 719–723
- Gäumann, E. (1946): *Pflanzliche Infektionslehre*. Basel: Birkhäuser
- Gotthardt, U.; Grambow H. J. (1992): Near-isogenic wheat suspension cultures: establishment, elicitor induced peroxidase activity and potential use in the study of host/pathogen-interactions. *Journal of Plant Physiology* (139), 659–665
- Grenier, J. (1990): Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3 (6), 401
- Groot, M. A. de; Bundock, P.; Hooykaas, P. J. J.; Beijersbergen, A. G. M. (1998): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16, 839–842
- Grove, J. F.; Pople, M. (1980): The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia* 70 (2), 103–105
- Guenther, J. C.; Trail, F. (2005): The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia* 97 (1), 229–237
- Guiraud, P. (1995): Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and Fungi Imperfecti. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32 (1), 29–33
- Ham, K.-S (1991): Host-pathogen interactions XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with β -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4 (6), 545–552
- Hamzehzarghani, H.; Kushalappa, A.; Dion, Y.; Rioux, S.; Comeau, A.; Yaylayan, V. (2005): Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against *Fusarium* head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66 (4), 119–133

- Hartley, R. D.; Ford, C. W.: Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability, ACS Symposium Series, 137–145
- Herebian, D.; Zühlke, S.; Lamshöft, M.; Spiteller M. (2009): Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. *Journal of Separation Science* 32 (7), 939–948
- Herrmann, M.; Zocher, R.; Haese, A. (1996): Effect of disruption of the enniatin synthetase gene on the virulence of *Fusarium avenaceum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9 (4), 226
- Hohn, T. M.; Beremand, P. D. (1989): Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79 (1), 131–138
- Hua, S.-S T.; Grosjean, O.-K; Baker, J. L. (1999): Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology* 29 (5), 289–291
- Huang, D.; Bhairi, S.; Staples, R. C. (1989): A transformation procedure for *Botryotinia squamosa*. *Current Genetics* 15 (6), 411–414
- Hutcheon, J. A. Jordan V. W. L. (1992): Fungicide timing and performance for *Fusarium* control in wheat. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases*, Farnham UK 2, 633–638
- Hynes, M. J. (1996): Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics* 75 (3), 297–311
- Ichinoe, M.; Kurata, H.; Sugiura, Y.; Ueno, Y. (1983): Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (6), 1364–1369
- Jackowiak, H.; Packa, D.; Wiwart, M.; Perkowski, J. (2005): Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat. *International Journal of Food Microbiology* 98 (2), 113–123
- Jackson, C. W.; Heale, J. B. (1987): Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in the entomopathogen *Verticillium lecanii*. *Microbiology* 133 (12), 3537–3547

- Jansen, C. (2005): Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proceedings of the National Academy of Sciences 102 (46), 16892–16897
- Jennings, P.; Coates, M. E.; Walsh, K.; Turner, J. A.; Nicholson, P. (2004b): Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. Plant Pathology 53 (5), 643–652
- Jestoi, M. N.; Paavanen-Huhtala, S.; Parikka, P.; Yli-Mattila, T. (2008): *In vitro* and *in vivo* mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. Archives of Phytopathology and Plant Protection 41 (8), 545–558
- Ji, L.; Cao, K.; Hu, T.; Wang, S. (2007): Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by PCR assay. Journal of Phytopathology 155 (7-8), 505–512
- Johansson, M.; Lundgren, L.; Asiegbu, F. O. (1998): Differential phenol-induced laccase activity and total oxidative capacity of the S and P intersterility groups of the conifer root pathogen *Heterobasidion annosum*. Microbiological Research 153 (1), 71–80
- Kang, Z. (2000b): Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. Mycological Research 104 (9), 1083–1093
- Kang, Z. (2002): Immunocytochemical localization of β -1,3-glucanase and chitinase in *Fusarium culmorum* -infected wheat spikes. Physiological and Molecular Plant Pathology 60 (3), 141–153
- Kang, Z.; Buchenauer, H. (2000a): Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. Journal of Phytopathology 148 (5), 263–275
- Kang, Z.; Huang, L.; Buchenauer, H. (2001a): Ultrastructural and cytochemical studies of effects of the fungicide metconazole on *Fusarium culmorum* *in vitro*. Journal of Plant Diseases and Protection 108, 419–432
- Kang, Z.; Huang, L.; Krieg, U.; Mauler-Machnik, A.; Buchenauer, H. (2001b): Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* *in vitro*. Pest Management Science 57 (6), 491–500
- Kang, Z.; Zingen-Sell, I.; Buchenauer, H. (2005): Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. European Journal of Plant Pathology 111 (1), 19–28

- Karlson, P.; Koolman, J.; Doenecke, D. (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage. Stuttgart: Thieme
- Kikot, G. E.; Hours, R. A.; Alconada, T. M. (2009): Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal of Basic Microbiology* 49 (3), 231–241
- Kim, D.-O; Lee, C. Y. (2004): Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (4), 253–273
- Kistler, H. C.; Benny, U. K. (1988): Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 13 (2), 145–149
- Kosiak, Barbara; Torp, Mona; Skjerve, Eystein; Thrane, Ulf (2003): The prevalence and distribution of *Fusarium*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 53 (4), 168–176
- Lagopodi, A. L.; Ram, A. F. J.; Lamers, G. E. M.; Punt, P. J.; van den Hondel, C. A. M. J. J.; Lugtenberg, B. J. J.; Bloemberg, G. V. (2002): Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (2), 172–179
- Lamb, C.; Dixon, R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (1), 251–275
- Lancashire, P. D.; Bleiholder H.; Boom T.; den Langelüddeke P. Stauss R. Weber E. Witzenberger A. (1991): A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* 119 (3), 561–601
- Laokuldilok, T.; Shoemaker, C. F.; Jongkaewwattana, S.; Tulyathan, V. (2011): Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (1), 193–199
- Lemmens, M.; Koutnik, A.; Steiner, B.; Buerstmayr, H.; Berthiller, F.; Schuhmacher, R. et al. (2008): Investigations on the ability of *Fhb1* to protect wheat against nivalenol and deoxynivalenol. *Cereal Research Communications* 36 (0), 429–435
- Lempereur, I. (1997): Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. In: *Journal of Cereal Science* 25 (2), S. 103–110.

- Lewis, D. H. (1973): Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biological Reviews* 48 (2), 261–277
- Logrieco, A.; Rizzo, A.; Ferracane, R.; Ritieni, A. (2002): Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1), 82–85
- Lorang, J. M.; Tuori, R. P.; Martinez, J. P.; Sawyer, T. L.; Redman, R. S.; Rollins, J. A. et al. (2001): Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5), 1987–1994
- Magan, N.; Hope, R.; Colleate, A.; Baxter, E.S (2002): Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108 (7), 685–690
- Maier, F. J.; Miedaner, T.; Hadel, B.; Felk, A.; Salomon, S. Lemmens M.; Kassner, H.; Schäfer, W. (2006): Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7 (6), 449–461
- Maniatis, T.; Fritsch E. F.; Sambrook, J. (1982): *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor
- Mańka, M. (1988): Cellulolytic activity of three *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. isolates pathogenic towards wheat seedlings. *Journal of Phytopathology* 122 (2), 113–117
- Martin-Tanguy, J.; Perdrizet, E.; Prevost, J.; Martin, C. (1982): Hydroxycinnamic acid amides in fertile and cytoplasmic male sterile lines of maize. *Phytochemistry* 21 (8), 1939–1945
- Matz, M. V.; Fradkov, A. F.; Labas, Y. A.; Savitsky, A. P.; Zaraisky, A. G.; Markelov, M. L.; Lukyanov, S. A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology* 17 (10), 969–973
- Mauch, F.; Mauch-Mani, B.; Boller, T. (1988): Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and -1,3-Glucanase. *Plant Physiology* 88 (3), 936–942
- McCallum, J. A.; Arnason, J. T.; Taylor, I. E. P.; Towers, G. H. N. (1992): Effects of UV-irradiation on enzymic digestion of barley coleoptile cell walls. *Journal of Plant Physiology* 139 (6), 641–646

- McKeehen, J. D.; Busch, R. H.; Fulcher, R. G. (1999): Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (4), 1476–1482
- McMullen J.; Jones R.; Gallenberg D. (1997b): Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81 (12), 1340–1348
- Mendgen, K.; Hahn, M.; Deising, H. (1996): Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34 (1), 367–386
- Messias, C. L.; Azevedo, J. L. (1980): Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 75 (3), 473–477
- Mesterhazy, A. (1973): The morphology of an undescribed form of anastomosis in *Fusarium*. *Mycologia* 65 (4), 916–919
- Mesterhazy, A. (2002): Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108 (7), 675–684
- Miedaner, T. (1997): Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* 116 (3), 201–220
- Mihuta-Grimm, L. (1989): Scab of wheat and barley in Southern Idaho and evaluation of seed treatments for eradication of *Fusarium* spp. *Plant Disease* 73 (9), 769–771
- Mikkelsen, L.; Sarrocco, S.; Lübeck, M.; Jensen, D. F. (2003): Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiology Letters* 223 (1), 135–139
- Miller, S. S.; Chabot, D. M. P.; Ouellet, T.; Harris, L. J.; Fedak, G. (2004): Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology* 26 (4), 453–463
- Milus, E. A.; Parsons, C. E. (1994): Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant disease* 78 (7), 697–699
- Mishra, N. C.; Tatum, E. L. (1973): Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (12), 3875–3879

Moerschbacher, B.; Heck, B.; Kogel K. H (1986): An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. II: Induction of enzymes correlated with the biosynthesis of lignin. *Zeitschrift für Naturforschung* (41c), 830–838

Moore, Jeffrey; Liu, Jian-Guo; Zhou, Kequan; Yu, Liangli (2006): Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (15), 5313–5322

Moradi, G. M. (2008): Microbiological and molecular assessment of interactions among the major *Fusarium* head blight pathogens on wheat ears. Dissertation Universität Bonn, online verfügbar unter <http://hss.ulb.uni-bonn.de/>

Moss, M. O.; Frank, J. M. (1985): Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society* 84 (4), 585–590

Mudge, A. M.; Dill-Macky, R.; Dong, Y.; Gardiner, D. M.; White, R. G.; Manners, J. M. (2006): A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69 (1-3), 73–85

Mueller-Harvey, I.; Hartley, R. D.; Harris, P. J.; Curzon, E. H. (1986): Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research* 148 (1), 71–85

Mugrabi Kuppler, A. L. de; Steiner, U.; Sulyok, M.; Krska, R.; Oerke, E.-C (2011): Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 151 (1), 78–86

Mullen, J. (1971): Production of an endo-polygalacturonate trans-eliminase by a potato dry-rot pathogen, *Fusarium roseum* 'Avenaceum', in culture and in diseased tissue. *Physiological Plant Pathology* 1 (3), 363–373

Nara, F.; Watanabe, I.; Serizawa, N. (1993): Development of a transformation system for the filamentous, ML-236B (compactin) - producing fungus *Penicillium citrinum*. *Current Genetics* 23 (1), 28–32

Nicholson, R. L.; Hammerschmidt, R. (1992): Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30 (1), 369–389

- Nirenberg, H. I. (1981): A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. Canadian Journal of Botany 59 (9), 1599–1609
- Ochiai, N.; Tokai, T.; Nishiuchi, T.; Takahashiando, N.; Fujimura, M.; Kimura, M. (2007): Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. Biochemical and Biophysical Research Communications 363 (3), 639–644
- Oliver, R. P.; Roberts, I. N.; Harling, R.; Kenyon, L.; Punt, P. J.; Dingemanse, M. A.; Hondel, C. A. M. J. J. (1987): Transformation of *Fulvia fulva*, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin B resistance. Current Genetics 12 (3), 231–233
- Orbach, M. J.; Porro, E. B.; Yanofsky, C. (1986): Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Molecular and Cellular Biology 6, 2452–2461
- Osborne, L. E.; Stein, J. M. (2007): Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. International Journal of Food Microbiology 119 (1-2), 103–108
- Paranidharan, V.; Abu-Nada, Y.; Hamzehzarghani, H.; Kushalappa, A. C.; Mamer, O.; Dion, Y. et al. (2008): Resistance-related metabolites in wheat against *Fusarium graminearum* and the virulence factor deoxynivalenol (DON). Botany 86 (10), 1168–1179
- Parry, D. W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathology 44 (2), 207–238
- Payne, G. A.; Brown, M. P. (1998): Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annual Review of Phytopathology 36, 329–362
- Pearce, R. (1982): Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. Physiological Plant Pathology 20 (1), 119–123
- Phalip, V.; Delalande, F.; Carapito, C.; Goubet, F.; Hatsch, D.; Leize-Wagner, E. et al. (2005): Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. Current Genetics 48 (6), 366–379
- Pirrung, M. C.; Nauhaus, S. K.; Singh, B. C. (1996): Cofactor-directed, time-dependent inhibition of thiamine enzymes by the fungal toxin moniliformin. Journal of Organic Chemistry 61 (8), 2592–2593

Pöggeler, S.; Masloff S.; Hoff B.; Mayrhofer S.; Kück U. (2003): Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Current Genetics* (43), 54–61

Ponts, N.; Pinson-Gadais, L.; Barreau, C.; Richard-Forget, F.; Ouellet, T. (2007): Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters* 581 (3), 443–447

Ponts, N.; Pinson-Gadais, L.; Verdal-Bonnin, M.-N.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. (2006): Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters* 258 (1), 102–107

Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 (2), 229–233

Proctor, R. H.; Hohn, T. M.; McCormick, S. P. (1995): Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichthecine toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8 (4), 593–601

Pugh, G.W.; Johann, H.; Dickson, J.G: Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research* 1933 (46), 771–797

Punt, P. J.; Oliver, R. P.; Dingemanse, M. A.; Pouwels, P.H; van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987): Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56 (1), 117–124

Reid, L. M.; Mather, D. E.; Arnason, J. T.; Hamilton, R. I.; Bolton, A. T. (1992): Changes in phenolic constituents of maize silk infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany* 70 (8), 1697–1702

Reid, L. M.; Nicol, R. W.; Ouellet, T.; Savard, M.; Miller, J. D.; Young, J.C et al. (1999): Interaction of *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 89, 1028–1037

Repka, V. (1999): Improved histochemical test for *in situ* detection of hydrogen peroxide in cells undergoing oxidative burst or lignification. *Biologia Plantarum* 42 (4), 599–607

Reverberi, M.; Ricelli, A.; Zjalic, S.; Fabbri, A. A.; Fanelli, C. (2010): Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3), 899–911

- Ride, J. P. (1992): Perspectives in plant cell recognition. Recognition signals and initiation of host responses controlling basic incompatibility between fungi and plants: Cambridge University Press
- Ride, J. P.; Barber, M. S.; Bertram, R. E. (1989): Infection-induced lignification in wheat. N. G. Lewis und M. G. Paice (Hg.): ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 361–369
- Ruiz-Diez, B. (2002): Strategies for the transformation of filamentous fungi. Journal of Applied Microbiology 92 (2), 189–195
- Ryan, C. A.; Farmer, E. E. (1991): Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42 (1), 651–674
- Samson, S. M.; Belagaje, R.; Blankenship, D. T.; Chapman, J. L.; Perry, D.; Skatrud, P. L. (1985): Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. Nature 318 (6042), 191–194
- Schatz, G.; Dobberstein, B. (1996): Common principles of protein translocation across membranes. Science 271 (5255), 1519–1526
- Schröder, H. W.; Christensen J. J. (1963): Factors affecting the resistance of wheat to scab caused by *Giberella zeae*. Phytopathology (53), 831–838
- Seong, K.-Y.; Zhao, X.; Xu, J.-R.; Güldener, U.; Kistler, H. C. (2008): Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology 45 (4), 389–399
- Shemyakin, M. M.; Ovchinnikov, Yu A.; Ivanov, V. T.; Antonov, V. K.; Vinogradova, E. I.; Shkrob, A. M. et al. (1969): Cyclodepsipeptides as chemical tools for studying ionic transport through membranes. The Journal of Membrane Biology 1 (1), 402–430
- Simpson, D. R.; Rezanoor, H. N.; Parry, D. W.; Nicholson, P. (2000): Evidence for differential host preference in *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivale*. Plant Pathology 49 (2), 261–268
- Simpson, D. R.; Thomsett, M. A.; Nicholson, P. (2004): Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. Environmental Microbiology 6 (1), S. 79–87

- Simpson, D. R.; Weston, G. E.; Turner, J. A.; Jennings, P.; Nicholson, P. (2001): Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* 107 (4), 421–431
- Siranidou, E.; Kang, Z.; Buchenauer, H. (2002): Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology* 150 (4-5), 200–208
- Skadsen, R. (2004): Use of *Fusarium graminearum* transformed with gfp to follow infection patterns in barley and *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64 (1), 45–53
- Skalamera, D.; Heath, M. C. (1998): Changes in the cytoskeleton accompanying infection-induced nuclear movements and the hypersensitive response in plant cells invaded by rust fungi. *The Plant Journal* 16 (2), 191–200
- Smith, M. M.; Hartley, R. D. (1983): Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research* 118, 65–80
- Snijders, C. H. A. (1990): Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. *Journal of Phytopathology* 129 (2), 133–140
- Soliday, C. L.; Kolattukudy, P. E. (1976): Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium roseum culmorum* and its immunological comparison with cutinases from *Fusarium solani pisi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 176 (1), 334–343
- Sosulski, F.; Krygier, K.; Hogge, L. (1982): Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (2), 337–340
- Spellig, T.; Bottin, A.; Kahmann, R. (1996): Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics* 252 (5), 503–509
- Sutton, J. C. (1982): Epidemiology of wheat ear blight and maize foot rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* (4), 195–209
- Sydenham, E. W.; Marasas, W. F.; Thiel, P. G.; Shephard, G. S.; Nieuwenhuis, J. J. (1991): Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* isolates. *Food Additives and Contaminants* 8 (1), 31–41

Szécsi, Á.; Bartók, T. (1995): Trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from corn in Hungary. *Mycotoxin Research* 11 (2), 85–92

Szecsi, A.; Bartok, T.; Varga, M.; Magyar, D.; Mesterhazy, A. (2005): Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *Journal of Phytopathology* 153 (7-8), 445–448

Tag, A. G.; Garifullina, G. F.; Peplow, A. W.; Ake, C.; Phillips, T. D.; Hohn, T. M.; Beremand, M. N. (2001): A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11), 5294–5302

Tekauz, A.; McCallum, B.; Gilbert, J. (2000): Review: *Fusarium* head blight of barley in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22 (1), 9–16

Thrane, C.; Lübeck, M.; Green, M. L.; Degefu, Y.; Allerup, S.; Thrane, U.; Jensen, D. F. (1995): A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: I. Transformation with the GUS gene by protoplast technology. *Phytopathology* 85 (11), 1428–1435

Turkington T. K.; Orr, D. D.; Clear, R. M.; Patrick, S. K.; Burnett, P. A.; Xi, K. (2002): Fungal plant pathogens infecting barley and wheat seed from Alberta, 1995-1997. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24 (3), 302–308

Uhlig, S.; Jestoi, M.; Knutsen, A. K.; Heier, B. T. (2006): Multiple regression analysis as a tool for the identification of relations between semi-quantitative LC-MS data and cytotoxicity of extracts of the fungus *Fusarium avenaceum* (syn. *Fusarium arthrosporioides*). *Toxicon* 48 (5), 567–579

Velluti, A.; Marín, S.; Bettuccia, L.; Ramos, A. J.; Sanchis, V. (2000): The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* 59 (1-2), 59–66

Vogelgsang, S.; Sulyok, M.; Hecker, A.; Jenny, E.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Forrer, H.-R. (2008): Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology* 122 (2), 265–276

Voigt, C. A.; Schäfer, W.; Salomon, S. (2005): A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal* 42 (3), 364–375

- Vollmer, S. J.; Yanofsky, C. (1986): Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Sciences 83 (13), 4869–4873
- Waalwijk, C.; van der Heide, R.; Vries, I. de; van der Lee, T.; Schoen, C.; Costrel-de Corainville, G. et al. (2004): Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. European Journal of Plant Pathology 110 (5/6), 481–494
- Wallace, G.; Fry, S. C. (1994): Phenolic components of the plant cell wall. International Review of Cytology 151, 229–267
- Wanjiru, W. M.; Kang, Z.; Buchenauer, H. (2002): Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. European Journal of Plant Pathology 108 (8), 803–810
- Ward, M.; Wilkinson, B.; Turner, G. (1986): Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned, oligomycin-resistant ATP synthase subunit 9 gene. Molecular and General Genetics 202 (2), 265–270
- Witzenberger, A.; van Boom, T. den; Hack, H. (1989): Erläuterungen zum BBCH-Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides. Gesunde Pflanze (41), 384–388
- Xi, K.; Turkington T. K. (2003): Systemic stem infection in barley and wheat by *Fusarium graminearum*. 3rd Canadian Barley Symposium, 19–20
- Xu, X.-M.; Monger, W.; Ritieni, A.; Nicholson, P. (2007): Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. Plant Pathology 56 (6), 943–956
- Xu, X.-M.; Parry, D. W.; Edwards, S. G.; Cooke, B. M.; Doohan, F. M.; Maanen, A. et al. (2004): Relationship between the incidences of ear and spikelet infection of *Fusarium* ear blight in wheat. European Journal of Plant Pathology 110 (9), 959–971
- Yao, Q.; Liu, Z.; Zeng, Y. (1996): Detoxification of deoxynivalenol by scab resistant wheat and the bioactivities of the product. Acta Mycologica Sinica 15, 59–64
- Yelton, M. M.; Hamer, J. E.; Timberlake, W. E. (1984): Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. Proceedings of the National Academy of Sciences 81 (5), 1470–1474

Yli-Mattila, T.; Paavanen-Huhtala, S.; Parikka, P.; Konstantinova, P.; Gagkaeva, T. Y. (2004): Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and North-Western Russia. *European Journal of Plant Pathology* 110 (5/6), 573–585

Zhou, K.; Hao, J.; Griffey, C.; Chung, H.; O'Keefe, S. F.; Chen, J.; Hogan, S. (2007): Antioxidant properties of *Fusarium* head blight-resistant and -susceptible soft red winter wheat grains grown in Virginia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (9), 3729–3736

Erklärung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am INRES – Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Abteilung Phytomedizin der Rheinischen Friedrich–Wilhelm-Universität Bonn durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Informationen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren versichere ich, dass ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder bei einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

Mensfelden, den 28.11.2012

Katharina Eiden

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit in unterschiedlichster Weise unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-W. Dehne für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Durchführung der Arbeit und die anregenden Diskussionen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Professor Dr. D. Bartels vom Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn für die Übernahme des Korreferats, für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie für die Möglichkeit der Durchführung der Southern Blots in ihrem Institut.

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. U. Steiner und Herrn PD Dr. E.-C. Oerke, die mich durch ihre Bereitschaft Fragen zu erörtern und zu beantworten, bei Problemen Hilfestellung zu leisten und mich mit konstruktiver Kritik während meiner gesamten Tätigkeit am Institut unterstützt haben.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Dr. H. Deising vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Phytopathologie und Pflanzenschutz der Universität Halle für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die Transformation von Pilzen zu erlernen, und Herrn Andreas Kiowski danke ich sehr für die freundliche Unterweisung in dieser Methodik.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Spiteller vom Institut für Umweltforschung der Universität Dortmund, insbesondere Herrn Dr. S. Zühlke, danke ich für die Durchführung der Mykotoxinanalysen.

Herrn Professor Dr. D. Menzel vom Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik danke ich für die Möglichkeit, die konfokalmikroskopischen Aufnahmen in seiner Abteilung zu machen. Seinem Mitarbeiter Dr. B. Voigt danke ich für die Hilfe beim Mikroskopieren.

Meinen Kollegen aus dem Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre sowie ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders erwähnen möchte ich Kerstin Lange, Jürgen Derpmann, Andreas Görtz, Ingrid Sikora und Ellen Laurentzen.

Sandra Weißbrodt danke ich für die Ratschläge für das Anfertigen meiner Arbeit und für das freundschaftliche Verhältnis über die Jahre.

Meiner Kollegin Constanze Sommer möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit am Institut und auf Reisen danken.

Einen ganz besonders herzlichen Dank möchte ich meinem Kollegen, aber vor allem auch persönlichen Freund, Stefan Neumann aussprechen für die vielen im Labor verbrachten gemeinsamen Stunden und seine zuverlässige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen anfallenden Arbeiten und Problemen.

Ein großer Dank geht auch an Herrn PD Dr. A. Schouten vom INRES - Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Abteilung Molekulare Phytomedizin, für die stetige Bereitschaft, mir bei allen Problemen besonders im Bereich der Molekularbiologie mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, die vielen anregenden Diskussionen im Verlaufe meiner Arbeit und die angenehme und freundschaftliche Nachbarschaft im Büro.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meiner Mutter, Frau Dr. Charlotte Eiden für die langjährige und vielfältige Unterstützung, all meinen Geschwistern und hierbei im Besonderen meiner Schwester Laura für die geduldige Hilfe beim Befestigen von Weizenblättern auf Plexiglasschienen.

Meinem Verlobten Marcos danke ich von ganzem Herzen für seine Unterstützung und seinen Beistand.

Lebenslauf

Name: Katharina Eiden
Geburtsdatum: 25.03.1981
Geburtsort: Bergisch Gladbach
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987 – 1991 Katholische Grundschule Bergisch Gladbach-Sand
1991 – 2000 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Bergisch Gladbach

Studium:

10/2000 – 08/2005 Diplomstudiengang Biologie an der Universität Bonn
08/2005 – 05/2006 Diplomarbeit im Unternehmen bioreact GmbH zum
Thema: „Bedeutung pilzlicher Enzyme in der Tiernahrung:
Entwicklung eines Enzympräparats“

Dissertation

seit 03/2007 Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz
(INRES), Abteilung Pflanzenkrankheiten

Berufsbezogene

Tätigkeiten:

08/2005 – 05/2006 Diplompraktikum bei der bioreact GmbH – Troisdorf
08/2006 – 03/2007 Vorbereitungspraktikum für die Promotion im Institut für
Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Abteilung
Phytomedizin

Berufliche

Laufbahn:

seit 10/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Forschungsanstalt
Geisenheim